Al chiarissimo Professore Pio Foà
con stima
gli Autori

DIREZIONE GENERALE DELLA SANITA' PUBBLICA

Laboratorio di Pianosa per la Preparazione del Vaccino Antipestoso.

VACCINAZIONI E SIEROPROFILASSI

NELLA

INFEZIONE PESTOSA

RICERCHE SPERIMENTALI

Dott. Prof. MAURO JATTA
Coadiutore

Dott. ROMANO MAGGIORA
Assistente

ROMA
TIPOGRAFIA DELLE MANTELLATE
—
1904

DIREZIONE GENERALE DELLA SANITA' PUBBLICA

Laboratorio di Pianosa per la Preparazione del Vaccino Antipestoso.

VACCINAZIONI E SIEROPROFILASSI

NELLA

INFEZIONE PESTOSA

RICERCHE SPERIMENTALI

Dott. Prof. MAURO JATTA
Coadiutore

Dott. ROMANO MAGGIORA
Assistente

ROMA
TIPOGRAFIA DELLE MANTELLATE
—
1904

INTRODUZIONE

La storia delle ultime epidemie pestose nelle Indie, in Africa ed in Europa ha dimostrato quanto fosse erronea l'opinione, che la peste avesse col tempo perduto la sua malignità e la sua forza di diffusione. Essa, dopo le moderne ricerche, a cui ha dato luogo l' infierire del morbo a Hong-Hong e a Bombay e dopo la scoperta dell' agente specifico e le cognizioni acquisite sull' epidemiologia dell' infezione pestosa, ha solamente perduto quel carattere di misterioso, di fatale e di spaventevole che ebbe nel Medio Evo.

Ad ogni modo dai centri endemici di Asia e di Africa la peste bubbonica minaccia sempre l'Europa. E l'aumentare ogni giorno delle relazioni di commercio e di traffico tra queste regioni e i paesi europei, rende sempre maggiori questi pericoli.

Non ostante questa continua minaccia, tutti gli igienisti sono concordi nel ritenere che l'Europa debba al pericolo di un' invasione di peste opporre quella calma, che suggerisce la coscienza di poter sempre, con mezzi opportuni e saggiamente adoperati, spegnere un focolaio pestoso, prima che l'epidemia assuma una grande e spaventevole diffusione.

Il *Koch* (1) scrivendo nel 1898 sulla diffusione della peste,

(1) *Koch R.* - Ueber die Verbreitung der Bubonenpest - Deutsche med. Wochenschrift - 1898 n. 28 p. 437.

affermava che osservando sulla carta i focolai pestosi allora esistenti nelle diverse regioni del mondo, si aveva l'impressione che la peste si ritirasse innanzi alla cultura che progrediva. Ma passò poco tempo e i fatti dichiararono per lo meno azzardata l'affermazione del *Koch* : poichè l' infezione pestosa, rompendo le dighe ad essa opposte dalla civiltà, comparve e si diffuse in diverse parti di Europa, che in un momento si vide seriamente minacciata dal terribile morbo. Innanzi al pericolo di un' invasione di un'epidemia pestosa, tutti gli stati europei non solo favorirono lo studio scientifico sull' infezione prodotta dal bacillo pestoso; ma si munirono di tutti i mezzi atti a combattere l'epidemia e fra l'altro fondarono istituti per la produzione del vaccino e del siero antipestoso. Fu appunto in quell' epoca che sorse questo nostro Laboratorio di Pianosa per la produzione del vaccino antipestoso.

Lo studio delle ultime epidemie ha stabilito, che la peste, a differenza del colera, non irrompe e si diffonde in poco tempo, assumendo enormi proporzioni in pochi giorni

La peste, anche quando il suo diffondersi viene favorito da speciali condizioni (sporcizia, agglomeramento di popolazione, epidemia pestosa nei ratti e nei topi, forme pulmonari ecc. ecc). ha bisogno sempre di un tempo più o meno lungo per assumere le proporzioni di una epidemia grave. Di qui la possibilità di poter sempre combattere con fortuna un focolaio di peste sul suo nascere : e nello stesso tempo la necessità di un intervento pronto ed energico, usufruendo di tutti i mezzi che le moderne cognizioni mettono a profitto del sanitario, tra cui l'uso delle vaccinazioni e del siero antipestoso.

L' *Haffkine* (1), che, come vedremo in seguito, fu il primo ad applicare su larga scala l'uso delle vaccinazioni nell'epidemia di peste, sostenne l'opinione, che per combatterla ogni misura igienica era inutile e che bisognava ricorrere esclusivamente alle vaccinazioni. Tutta la stampa indiana magnificò le idee e le

(1) *Haffkine-Remarks* on the plague prophylactic fluid - British med. Iournal 1897 . . . A Conversation on the preventive inoculation against plague 1897.

vaccinazioni di *Haffkine*, che, dice lo *Schottelius* [1] divenne in breve tempo l'uomo il più popolare nelle Indie, un vero profeta.

Le idee assolutiste ed esclusiviste dell'*Haffkine* provocarono le critiche del *Bitter* [2], il quale ritenne molto discutibile il valore delle vaccinazioni all'*Haffkine,* attaccò i risultati e le statistiche pubblicate dall'*Haffkine* ed escluse che un epidemia pestosa si possa e si debba combattere esclusivamente colle vaccinazioni. Il Bitter invece propugna l'opinione, che la peste debba essere combattuta solamente coi provvedimenti di natura igienica.

Le stesse idee furono sostenute dal *Gottschlich* [3] a proposito dell'epidemia pestosa di Alessandria nel 1899.

« Il fatto - scrive il *Gottschlich* - che si è riuscito a domare « la peste in una città orientale con più di 320.000 abitanti e con « una grande popolazione fluttuante solamente ed unicamente « coll'uso energico di provvedimenti sanitari, è una dimostra- « zione che nel combattere la peste si deve dare la massima im- « portanza alle regole di natura igienica. Le vaccinazioni all'*Haff-* « *kine* in questa epidemia non furono usate affatto. Su 920 per- « sone tenute in osservazione, solo due ammalarono leggermente « di peste : su 800 persone : medici, infermieri, individui desti- « nati alle disinfezioni, che venivano continuamente in contatto « con ammalati di peste, nessuno ammalò : nella caserma di Mo- « harrem-Bey fortemente infettata, dopo l'evacuazione e la di- « sinfezione, fra 160 soldati uno solo ancora contrasse la peste ». E il *Gottschlich* esclama : quale splendida dimostrazione questi fatti avrebbero potuto dare per l'efficacia del vaccino *Haffkine* se esso fosse stato adoprato ! Secondo il *Gottschlich* le vaccinazioni all'*Haffkine* sono al massimo da ritenersi come l'*ultimum refugium* nei casi in cui o per ragioni esterne o per la enorme diffusione del morbo i provvedimenti sanitari non sono più in grado di dominare l' epidemia.

(1) *Max Schottelius.* - Die Bubonenpest in Bombay im Frühjahr 1890 - Hyg. Rundschau 1901.

(2) *H. Bitter.* - Ueber die Haffkine'schen Schutzimpfungen gegen Pest und die Pestbekämpfung in Indien. - Zeitschr. f. Hygiene Bd. xxx. 1899.

(3) *Gottschlich.* - Die Pest-Epidemie in Alexadrien im Jahre 1899 - Z. f. Hyg Bd. xxxv. 1900.

A noi sembra che mettere la questione in questi termini, significa spostarla, perchè tra i provvedimenti d' indole igienica e la profilassi medica si viene a creare un dissidio che non esiste, nè deve esistere. Fino a quando non sarà dimostrata la nessuna efficacia delle vaccinazioni antipestose all'*Haffkine* come mezzo di profilassi verso l'infezione pestosa la idea di *Bitter* e di *Gottschlich* di decretarne l'ostracismo non è affatto giustificata. E se a priori deve ritenersi insostenibile l'opinione dell'*Haffkine* di combattere la peste colle sole vaccinazioni, pur non di meno non si dovrà in nessun modo rinunziare alle vaccinazioni, se esse sono effettivamente efficaci, come mezzo sussidiario delle regole sanitarie, per arrestare il diffondersi di un epidemia pestosa. Noi anzi crediamo che in questi casi sia doveroso per i sanitari avvalersi di tutti quei mezzi che la scienza mette a loro disposizione, non solo per spegnere l' infezione, ma per garantire tutte quelle persone (medici, infermieri, assistenti, persone incaricate delle disinfezioni, operai adibiti in località infette ecc.) che durante una epidemia corrono ogni giorno il pericolo d' infettarsi, non ostante le maggiori precauzioni igieniche.

Nè le critiche del *Bitter* quindi, nè l'esperimento fatto ad Alessandria dal *Gottschlich*, possono giustificare l'abbandono incondizionato, nella profilassi dell' infezione pestosa, delle vaccinazioni e della sieroterapia.

Quello che invece, secondo noi, va bene studiato e stabilito, prima di emettere un giudizio sull'argomento, è in primo luogo l'efficacia di una tale profilassi, e in secondo luogo i limiti e le condizioni in cui essa può e deve essere adoperata con vantaggio. A provare l'efficacia delle sue vaccinazioni nella profilassi della peste, l'*Haffkine* si fondò sulle numerose statistiche dei risultati ottenuti nell'uomo.

Il *Bitter* cita le statistiche dell'*Haffkine* e le sottomette a critica severa. Egli riconosce, che i vaccinati hanno mostrato una notevole immunità verso l'infezione pestosa; ma non vede ben dimostrato che tal fatto sia effettivamente dovuto alle vaccinazioni. In tutte le statistiche mancano i dati, secondo il Bitter,

per formarci un concetto esatto, se realmente i vaccinati e i non vaccinati sieno stati esposti nello stesso modo all' infezione, e se appartenessero alla stessa razza e alla medesima classe di cittadini. Il dottor *Herbert* (1) stesso, sebbene si mostri favorevole al metodo delle vaccinazioni antipestose, non può fare a meno di notare, che i vaccinati a Bombay rimasti quasi tutti illesi, appartenevano a quella classe di persone che già per natura è meno esposta al pericolo d' infezione.

Anche il *Lustig* (2) nota le difficoltà nelle Indie a stabilire sull'uomo degli esperimenti di vaccinazione e conclude così: « le difficoltà che incontrano le vaccinazioni preventive contro « la peste in India, qualunque sia il metodo preventivo che si « voglia adottare, non permetteranno mai, che questo problema « abbia una soluzione seria, disinteressata.

Da quì la necessità, per risolvere il problema, di stabilire delle ricerche sugli animali. Il solo studio sperimentale può assodare su dati sicuri, se è possibile conferire agli animali una immunità attiva (vaccinazione) e un' immunità passiva (trattamento col siero) verso l' infezione pestosa.

La soluzione di questo problema fondamentale è indispensabile per giudicare dell'opportunità di servirsi nella pratica delle vaccinazioni e del siero antipestoso. Nè basta. É necessario anche stabilire con ogni precisione e su dati sicuri, i limiti e le condizioni in cui queste pratiche possono dare utili risultati.

Certo non mancano delle ricerche sperimentali su questo argomento: ma noi abbiamo creduto non del tutto privo d' interesse istituire una serie di esperienze su largo materiale di studio, per portare un contibruto sperimentale alla questione di tanta importanza scientifica e pratica delle vaccinazioni e dell'uso del siero antipestoso nella profilassi della peste.

E tanto più opportuno ci è sembrato questo lavoro, in quanto le idee manifestate dagli autori su questo argomento

(1) Citato dal Lustig.

(2) *Lustig.* - Sieroterapia e vaccinazioni preventive contro la peste bubbonica - 1899.

sono tutt'altro che concordi: e perchè manca una serie di ricerche comparative sui diversi vaccini e sui diversi metodi di vaccinazione antipestosa, messi in relazione coi risultati ottenuti col siero antipestoso usato come mezzo protettivo.

Per compiere queste nostre ricerche ci siamo dovuti recare nel Laboratorio della Direzione generale di sanità per la fabbricazione del vaccino antipestoso posto nell' Isola di Pianosa. Disponendo di un tempo limitato, abbiamo dovuto contentarci di trattare l'argomento nelle sue linee generali, rinunziando a quelle ricerche, come per. es. quelle sulla durata dell' immunità conferita coi diversi metodi, che avrebbero richiesto un tempo di osservazione superiore a quello concesso alla nostra missione nel Laboratorio di Pianosa.

Abbiamo diviso le nostre ricerche in quattro serie. La prima comprende gli esperimenti sulle vaccinazioni eseguite coi diversi vaccini antipestosi: la seconda gli esperimenti sulle vaccinazioni ripetute: la terza sul potere protettivo del siero: la quarta sull'uso del siero e delle vaccinazioni cotemporaneamente (siero-vaccinazioni).

Con queste nostre ricerche abbiamo creduto di fare uno studio di controllo con largo materiale sull'efficacia delle vaccinazioni e della sieroprofilassi, per proteggere gli animali da un' infezione pestosa. E nell'accingerci a queste ricerche non scevre di pericoli siamo stati sorretti dalla speranza, che il contributo di fatti da noi portato alla importante questione, possa da un lato riuscire utile e d'altra parte restare come un documento dell'attività della sezione Controlli annessa al Laboratorio di micrografia della Direzione di sanità.

Tanto più opportuno ci è parso sottomettere questo argomento delle vaccinazioni e della sieroprofilassi come mezzi protettivi verso l'infezione pestosa a delle ricerche sperimentali, in quanto spesso questi prodotti sono più considerati dal lato commerciale che da quello scientifico. Molti giudizi dettati sotto la preoccupazione di dimostrare ad ogni costo l'efficacia dei propri prodotti, non sono certo i più adatti per farci formare un criterio esatto sul valore reale dei vaccini e dei sieri

antipestosi. Un criterio esatto ed ispirato unicamente a considerazioni scentifiche s'impone per il sanitario, che nella pratica deve ricorrere all'uso delle vaccinazioni e della sieroprofilassi. Questo criterio bisogna sopratutto desumerlo da dati sperimentali, non da preconcetti e da idee astratte. In questo senso lo scetticismo di alcuni e l' ottimismo di altri hanno lo stesso significato.

Chiarito in tal modo lo scopo e l'opportunità di questo nostro lavoro, sentiamo il dovere di ringraziare il Direttore generale della Sanità Comm. Santoliquido, e il Direttore del Laboratorio prof. Gosio, per averci permesso di recarci all' Isola di Pianosa ad espletare queste nostre ricerche.

PARTE PRIMA

VACCINAZIONI

I. Letteratura.

Primi ad immunizzare degli animali verso il bacillo della peste, furono gli autori francesi *Yersin*, *Calmette e Borrel*. (1) Appena isolato il bacillo della peste nell'epidemia di Hong-Kong, contemporaneamente al *Kitasato*, il *Yersin* in collaborazione col *Calmette* e col *Borrel* istituì delle ricerche d'immunizzazione attiva sugli animali allo scopo precipuo di ottenere un siero curativo.

Gli autori riuscirono ad immunizzare contro dosi sicuramente mortali del bacillo pestoso i conigli a cui inocularono ripetutamente sottocute o nel peritoneo l'emulsione in brodo di culture di bacillo pestoso su agar, uccise per un'ora alla temperatura di 58°.

Dopo 3-4 inoculazioni ripetute a diversi intervalli di tempo, i conigli furono resi refrattari verso una dose di bacillo pestoso sicuramente mortale. Le cavie invece si mostrarono meno adatte ad essere immunizzate e difficilmente essi riuscirono a renderle completamente immuni verso dosi mortali di bacillo pestoso vivente.

Mentre gli autori francesi continuarono i lori studi allo scopo di produrre un siero antipestoso, *Haffkine*, (2) come abbiamo già detto, applicò all'uomo la vaccinazione con culture morte di bacillo della peste come mezzo di profilassi verso l'infezione pestosa.

(1) *Yersin*. - *La peste bubonique à* Hong - Kong Annal. Ist: Pasteur 1894. - *Yersin, Calmette et Borrel*. - La peste bubonique Ann. Pasteur 1895.

(2) l. c.

Nel 1896 egli fondò un laboratorio a Bombay, ove preparò su vasta scala il suo vaccino e, dopo averlo sperimentato negli animali, lo diffuse nella pratica, sostenendo l'opinione, come abbiamo visto, che l' infezione pestosa si dovesse eslusivamente combattere, immunizzando col suo vaccino tutti gli uomini verso di essa.

A dimostrare l'efficacia delle sue vaccinazioni, riporta l'*Haffkine* (1) nelle sue molteplici pubblicazioni numerose statistiche dei risultati ottenuti in diverse epidemie.

Noi qui ne citeremo qualcuna, rimandando il lettore che desiderasse maggiori notizie alla relazione della Commissione indiana par le ricerche sulla peste (2).

Quando nel 23 gennaio 1897 scoppiò la peste nella prigione di Byculla (Bombay) dopo 10 giorni si ebbero 15 casi con 8 morti. Al mezzodì del decimo giorno, l'*Haffkine* inoculò colla sua linfa 154 prigionieri : uno di questi era già ammalato, altri due ammalarono la stessa sera tutti e tre morirono di peste. Di 173 prigionieri ammalarono di peste durante l'epidemia 12 : dei vaccinati ne ammalarono solamente 2, che guarirono.

Nei quartieri infetti di Bombay furono inoltre vaccinati fino al 6 maggio 1897 circa 12.362 persone : di cui 12 morirono di peste : 3 già ammalati : 3 ammalarono nelle prime 24 ore e gli altri tra i 2-25 giorni dopo la vaccinazione : altri 33 casi guarirono.

Nella colonia portoghese di Damaun al nord di Bombay, su 62 famiglie alcune furono inoculate, altre no. Si ebbe il seguente risultato : di 250 vaccinati, ammalarono 50, morirono 20 ; di 124

(1) *W. M. Haffkine*. - Remarks on the plague prophylactic fluid - Britisch med. Journal 1897 - Experiment on the effect of protective inoculation in the epidemie of plague at Undhera (Taluka Baroda) 1898 - The Times of India press, 2214. 1898 - and *W. B. Banermann* - The testing of Haffkine 's plague prophylactic in plague, stricken communities in India - Brit. med. Journal 24 sept. 1898.

Pojares. - As inoculaçoes prophylacticas na peste de Damao - A medicina contemporanea 1897.

Haffkine '*s* inoculations against plague - Results of britisch medical Journal 1897.

(2) Report of te Indian plague Commission - London - 1901.

non vaccinati ammalarono 54, morirono 37. Anche in Damaun furono inoltre vaccinate 2197 persone, di cui morirono di peste 36; mentre di 6033, che non furono vaccinate ne morirono 1482.

Degni di essere ricordati sono i risultati ottenuti nell'epidemia di Undhera (Baroda). In Undhera, villaggio di 950 abitanti, il 12 febbraio 1898, in ogni casa fu sottomessa alla vaccinazione antipestosa la metà di tutti gli uomini, di tutte le donne, di tutti i fanciulli. Si ebbero così 513 inoculati e 437 non inoculati.

La epidemia pestosa durò ancora 42 giorni fino al 28 marzo. Furono colpite dalla peste 28 famiglie: 64 membri di queste famiglie non erano vaccinati: di questi ammalarono 27 e ne morirono 26: di 71 membri vaccinati ne ammalarono solo 8 e ne morirono 3.

A queste statistiche altre ne aggiunse l' *Haffkine* stesso e i diversi medici che ebbero occasione d'applicare all'uomo le vaccinazioni antipestose. La stampa indiana è piena di rapporti sull'efficacia delle vaccinazioni *Haffkine*, applicate come mezzo profilattico nell'epidemia pestosa.

Data la natura del nostro lavoro riferiremo solamente sulle ricerche sperimentali istituite sull'argomento.

I risultati ottenuti sull'uomo solo allora potranno acquistare intero il loro valore, quando l'esperimento avrà dimostrato che è possibile, mediante l' iniezione di culture morte di peste, conferire una sufficiente immunità verso dosi sicuramente mortali di bacillo pestoso vivente.

Il Klein [1] infatti negò la possibilità di immunizzare gli animali verso la peste. Egli inoculò le cavie per 3-4 volte, a diverso intervallo di tempo, con dosi subletali di bacillo pestoso vivente. Le cavie ammalarono sempre in seguito all' infezione, ma guarirono completamente. Inoculate 18 giorni dopo l'ultima infezione, con dosi mortali esse soccombettero coi classici sintomi della setticemia pestosa. Anche le ripetute inoculazioni sottocutanee e intraperitoneali di culture morte non conferirono alle cavie nessuna notevole immunità verso l' infezione pestosa.

(1) *Klein.* - Ein Beitrag zur Morphologie und Biologie des Bacillus der Bubonenpest - Centr. f. Bakt. Bd. XXI. 1897.

Nemmeno nei conigli potè il *Klein* ottenere colle ripetute inoculazioni di culture morte una notevole protezione verso l'infezione con dosi mortali.

Al *Kolle* (1) invece riuscì d'immunizzare 5 ratti e 4 cavie, mediante l'inoculazioue sottocutanea di culture di peste su agar emulsionate in brodo e riscaldate per parecchie ore a 65°.

Una parte importante nella vaccinazione e sieroterapia della peste spetta al prof. *Lustig*, il quale in compagnia dei suoi aiuti ha fatto importanti ricerche sull'argomento.

Il *Lustig* ed il *Galeotti* (2) nel 1897, dopo aver notato che col metodo di *Yersin*, *Calmette* e *Borrel*, erano necessarie molte inoculazioni per conferire agli animali una completa immunità, tentarono di abbreviare il periodo di immunizzazione seguendo lo stesso metodo; ma le loro ricerche riuscirono negative. Essi allora, partendo dal concetto che i filtrati delle culture in brodo di bacillo pestoso si mostravano del tutto privi di azione e che la parte tossica nel bacillo della peste era intimamente legata al corpo bacillare, cercarono di estrarre da esso la sostanza vaccinante. Mediante un procedimento chimico, che non mancheremo di descrivere minutamente, quando ci occuperemo dei diversi vaccini antipestosi, estrassero gli autori dal bacillo della peste una sostanza appartenente al gruppo dei nucleoproteidi.
Con numerose esperienze gli autori stabilirono, che questa sostanza in piccole dosi era tossica per i ratti, i topi ed i conigli. Inoculata invece in dosi non mortali, non produceva nessuna reazione locale; e gli animali già dopo 48 ore mostravano una notevole immunità verso l'infezione con bacilli pestosi viventi.

Il *Lustig* ed il *Galeotti* vaccinarono con questo estratto dei corpi bacillari più di 115 tra ratti e topi, 30 conigli e 15 cavie.

Riportiamo qui quasi integralmente le conclusioni a cui arrivarono gli autori con queste loro ricerche.

Dalle culture di bacilli pestosi si può ricavare mediante procedimento chimico una sostanza colle proprietà dei nucleopro-

(1) *Kolle.* - Zur Bakteriologie der Beulenpest. D. med. Woch. 1897 p. 146.

(2) *Lustig und Galeotti.* - Versuche mit Pestschutzimpfungen bei Thieren - D. med. Woch. 1897 p. 227 e p. 289.

teidi. Questa sostanza è velenosa in grado significante per gli animali; ma se essa è inoculata sottocute o nel peritoneo in dosi non mortali negli animali suscettivi per la peste, non solo diventa innocua, ma rende questi animali immuni verso dosi sicuramente mortali di bacilli pestosi inoculati sotto cute o nel peritoneo.

In altro lavoro (1) gli autori ritornano sullo stesso argomento e assicurano che il loro vaccino sciolto in acqua sterile e filtrato alla candela si mostrò del tutto innocuo nell'uomo, senza perdere le sue eminenti qualità vaccinanti.

Ottimi risultati ottennero col vaccino *Lustig*, *Galeotti* e *Malenchini*, (2) sperimentando a Bombay sulle piccole scimmie grigie, che sono molto sensibili verso l'infezione pestosa. Riferiamo qui in breve i risultati di queste esperienze:

6 scimmie furono vaccinate tre volte e ricevettero in tutto 1,705. 1,47; 1,41; 1,75; cgr. di vaccino;

2 scimmie furono vaccinate due volte e ricevettero in tutto 1,41, cgr. di vaccino;

2 scimmie furono vaccinate una sola volta con 1.88 cgr. di vaccino: una morì, l'altra ammalò, ma si rimise completamente. Tutte queste 9 scimmie sopportarono bene l' infezione con dosi di bacillo pestoso, che uccideva in poco tempo l'animale di controllo. Le scimmie tre volte furono infettate per la via del peritoneo, 6 volte sotto cute. In due casi l' infezione avvenne 18 giorni dopo l'ultima vaccinazione; in uno dopo 24 giorni, in 3 dopo 22 giorni e in tre casi dopo 16 giorni.

Secondo gli autori una sola vaccinazione è sufficiente per ottenere una completa immunizzazione delle scimmie.

Nella sua pubblicazione « Sieroterapia e vaccinazioni preventive contro la peste bubbonica » il prof. *Lustig* ci dà un' estesa esposizione di tutte le esperienze fatte da lui e dai suoi allievi sull'efficacia del vaccino antipestoso preparato col suo metodo, insistendo sui buoni risultati ottenuti anche nell'uomo.

(1) Deutsche med. Woch. 1897 p. 289.

(2) *Galeotti und Malenchini.* - Experimentelle Untersuchungen bei Affen über die Schutzimpfung und die Serumtherapie gegen die Beulenpest - Centr. f. Bact. 1897 Bd. XXII p. 508.

Scoppiata l'epidemia di peste a Bombay, diversi Stati europei inviarono in India delle commissioni scientifiche per studiare tutte le quistioni inerenti all' infezione pestosa. Uno degli argomenti che richiamò la speciale attenzione di dette commissioni fu naturalmente lo studio delle vaccinazioni preventive, che esse sottomisero a ricerche sperimentali sugli animali e specialmente sulle scimmie.

Wyssokowitz e Zabolotny [1] riferendo negli annali *Pasteur* i risultati delle ricerche istituite dalla commissione russa sulle scimmie, che sono sensibilissime verso la peste, si limitano ad affermare riguardo alle vaccinazioni antipestose quanto segue: l' immunità risultante dalla inoculazione preventiva fatta con culture su agar emulsionate in brodo e riscaldate per un ora a 60°, non si produce prima dei 7 giorni; ma questa immunità si prolunga per molto tempo. Una scimmia vaccinata con questo procedimento e infettata 21 giorni dopo l' inoculazione non mostrò nessun sintomo di peste.

Iniettando invece una grande quantità di culture di peste su agar emulsionate in brodo e riscaldate per un'ora a 60°, l'animale si indebolisce e diventa più sensibile verso l' infezione pestosa. Molto importanti sono i dati che sulle vaccinazioni antipestose ci hanno fornito gli studi della commissione tedesca inviata a Bombay per lo studio della peste. I risultati delle esperienze di questa commissione si trovano accennati nel numero del 5 agosto 1897 della « Deutsche medicinische Wochenschrift » più diffusamente trattati in una pubblicazione del *Dieudonné* [2] e nella monografia [3] pubblicata dall'ufficio di Sanità dell' impero tedesco. Questa monografia, scritta dai membri della commissione: *Gaffky, Pfeiffer, Sticker* e *Dieudonné*, rappresenta senza alcun

(1) *Wyssokowitz et Zabolotny.* - Recherches sur la peste bubonique - Annales Pasteur 1897.

(2) *Dieudonné.*-Ueber die Resultate der Yersin' schen und Haffkine' schen Immunisierung und Heilungsversuche bei Pest. - Münch. med Wochens. 1898 n. 6 p. 166.

(3) Bericht über die Thätigkeit der zur Erforschung der Pest im Iahre 1897 nach Indien entsandten Kommission - Arbeiten aus dem Kais. Gesundheitsamte - B. XVI. Berlin 1899.

dubbio il lavoro più completo e più prezioso sullo studio della peste bubbonica. Noi quì cercheremo di ricapitolare nel modo migliore le esperienze istituite da questa commissione sulle vaccinazioni antipestose.

Le condizioni necessarie per un metodo pratico di vaccinazioni contro la peste, secondo la commissione tedesca, sono le seguenti:

1) una sola vaccinazione deve bastare;

2) essa non deve essere pericolosa.

Questa seconda condizione deve fare escludere nell'uomo l'uso di culture vive e virulente, quantunque esperienze sui macachi abbiano dimostrato, che l'avere per una volta superata un'infezione pestosa, conferisce un'immunità assoluta verso l'infezione, anche se questa avviene nel modo più grave.

Le sostanze immunizzanti nel bacillo pestoso sono intimamente legate ai corpi bacillari. Mentre coi filtrati delle culture liquide gli autori non hanno potuto conferire nessuna immunità negli animali, colle culture uccise al calore hanno prodotto una forte immunizzazione.

Tutti i macachi che ricevettero sottocute un'intera cultura su agar, emulsionata in brodo e uccisa per un 'ora a 60° sopravvissero all'infezione prodotta da un'ansa di platino di cultura viva e virulenta di bacillo pestoso.

La Commissione tedesca sostiene l'opinione, che la differenza tra l'immunità prodotta dalle culture vive e quella prodotta dalle culture uccise al calore sia solamente *quantitativa* e non *qualitativa*, nel senso che nelle culture viventi agiscono sul corpo dell'animale delle sostanze immunizzanti, che mancano nelle culture sottoposte all'azione del calore.

Dalle ricerche istituite sui macachi risulta che l'immunità attiva per manifestarsi negli animali ha bisogno di un certo tempo: solo dopo 7 giorni si manifesta una completa immunizzazione, di cui le prime tracce si trovano dopo 4-5 giorni.

Sulla durata di tale immunità attiva gli autori non hanno esperimenti propri, ma per analogia essi opinano, che duri parecchi mesi.

La Commissione tedesca studiò anche l'azione di diversi agenti

chimici sul bacillo pestoso per ciò che riguarda il modo di compotarsi delle sostanze immunizzanti. Così essa vide, che l'acido fenico nella diluzione del 0. 5 $^0/_0$ distrugge le sostanze immunizzanti del bacillo pestoso, se agisce sulle culture fresche ancora viventi; ma se le culture furono uccise al calore e dopo si aggiunge acido fenico al 0. 5 $^0/_0$ esso non ha azione alcuna sulle sostanze immunizzanti.

Il cloroformio pare invece che uccida il bacillo della peste, senza alterarne le sostanze immunizzanti; ma gli autori preferiscono di preparare il vaccino, uccidendo le culture col metedo del calore. Essi hanno anche assodato che l'ebollizione distrugge in poco tempo ogni potere immunizzante. Per uccidere le culture quindi non bisogna spingere la temperatura al di là dei 60-65 gradi centigradi.

La Commissione tedesca ha anche sperimentato il vaccino *Lustig.* Quantunque ascriva ad esso notevole azione immunizzante, pur nondimeno dichiara che con questo vaccino ha avuto risultati poco favorevoli e non è da preferirsi alle culture su agar emulsionate in brodo e uccise al calore. Secondo la Commissione tedesca il *Lustig* ha potuto essere tratto in erronei apprezzamenti sul valore reale del vaccino preparato col suo metodo, dal fatto di avere usato le inoculazioni intraperitoneali. In tal caso il *fenomeno di resistenza* lo avrebbe potuto condurre ad un giudizio erroneo sulla vera immunità. La Commissione tedesca avanza il dubbio, che le sostanze chimiche adoperate nella preparazione del vaccino *Lustig,* possano esercitare un'azione nociva sulle sostanze immunizzanti contenute nel bacillo pestoso.

Siccome tutte le esperienze furono fatte dalla Commissione tedesca sui macachi, che posseggono una suscettività relativamente piccola verso la peste, essa credette utile estendere le ricerche su animali estremamente sensibili, come le scimmie grigie e i ratti. Tanto più che l' uomo è meno resistente dei macachi verso l' infezione pestosa e che per il modo di comportarsi verso di essa si avvicina più ai ratti e alle scimmie grigie che ai macachi. Da queste ricerche risultò, che men-

tre una cultura su agar, emulsionata in brodo e uccisa al calore, bastò per salvare un macaco dall' infezione con un'ansa di platino di bacillo pestoso vivo e virulento: essa non fu sufficiente per salvare 4 scimmie grigie (Semnopitecus entellus) e i ratti, di cui ritardò solo l'esito fatale a paragone dei controlli.

Per salvare i ratti dall' infezione con un'ansa di cultura, fu necessario spingere la dose di vaccino fino a due culture su agar emulsionate in brodo e uccise tenendole per un'ora a 65°.

L'azione delle vaccinazioni antipestose, per la commissione tedesca, è indipendente dal modo d' inoculazione: colle inoculazioni intraperitoneali si ottengono i medesimi risultati che colle inoculazioni sottocutanee.

Secondo la Commissione tedesca, anche l' uomo che è meno sensibile dei ratti, può essere immunizzato verso la peste con una sola inoculazione di vaccino, costituito da culture di peste su agar emulsionate in brodo e uccise per un'ora a 65°. Come quantità minima di tale vaccino da inoculare nell'uomo, la Commissione tedesca stabilisce una cultura su agar ben sviluppata per 2-3 giorni.

Il *Dieudonnè*, fondandosi sui risultati ottenuti a Bombay dalla commissione tedesca, afferma che alle vaccinazioni antipestose *Haffkine* spetta un alto valore protettivo, ma che questo non è affatto assoluto.

Prima in una nota preventiva e poi in un lavoro comparso nella « Deutsche med. Wochenschrift » il *Terni e Bandi* (1) sostengono invece l'opinione che la linfa vaccinica *Haffkine* presenta tali e tanti inconvenienti da dovere essere esclusa dalla pratica. E gl' inconvienti maggiori secondo gli autori sarebbero:

1) la lenta preparazione di grandi dosi;

2) la lentezza con cui si manifesta l' immunità attiva (10-12 giorni):

3) il pericolo delle vaccinazioni eseguite nel periodo d' incubazione della malattia.

(1) *Terni e Bandi*.-Un nuovo metodo di preparazione del vaccino antipestoso Messina 1899. Bereitung der antipestösen Lymphe aus dem peritonealen Exsudat der inficirten Thiere. D. med. Wochenschrift 1900, p. 463.

Gli autori hanno creduto di ovviare a questi inconvienti, ricorrendo alla preparazione di un vaccino antipestoso capace anche di conferire una temporanea immunità passiva.

Il metodo del *Terni e Bandi* consiste in questo; cavie di 350-500 grammi di peso sono infettate con bacillo pestoso virulento nel peritoneo: si raccoglie l'essudato che si forma nella cavità peritoneale, lo si diluisce e si sterilizza frazionatamente. Si aggiunge in seguito del carbonato sodico e dell'acido fenico: e l'emulsione così ottenuta s'inietta nella dose di 2,2 $^1/_2$ cmc. per l'uomo.

Con una serie di esperienze comparative tra la linfa *Haffkine* ed il loro vaccino gli autori hanno creduto di aver constatato:

1) i gravi effetti che produce sugli animali il vaccino *Haffkine* anche in dose di $^1/_{10}$ di cmc. e la tenue reazione prodotta dal vaccino preparato col loro metodo;

2) i migliori risultati avuti col loro vaccino rispetto a quelli ottenuti col vaccino *Haffkine*;

3) la rapida comparsa dell'immunità nelle inoculazioni col vaccino preparato col loro metodo, mentre questa col vaccino *Haffkine* non compare prima dei 10-12 giorni. Gli autori infatti riportano una serie di esperienze, da cui risulta, che gli animali inoculati colla linfa vaccinica *Haffkine* subito dopo essere stati infettati di peste, muoiono prima dei controlli: mentre che gli animali infettati e dopo inoculati col loro vaccino muoiono qualche ora dopo o contemporaneamente ai controlli. Per gli autori basta questa piccola differenza per attribuire al loro vaccino il potere di provocare una pronta immunità!

Secondo il prof. *Lustig* (1) invece le difficoltà inerenti al metodo *Terni-Bandi* sono tali e tante, che a prima vista si può negargli ogni importanza pratica. Vedremo in seguito le critiche mosse a questo vaccino.

Nella conferenza scientifica promossa nell'ottobre 1899 dall'Ufficio di Sanità dell'Impero germanico, su tutte le questioni ine-

(1) *A. Lustig.*-Intorno ai metodi d'inoculazione preventiva contro la peste bubbonica. Rivista d'igiene e di sanità pubblica 1899.

renti alla peste, [1] fu anche agitata quella delle vaccinazioni antipestose. Il *Pfeiffer*, uno dei membri della Commissione tedesca a Bombay, notò come le esigenze a cui devono rispondere le vaccinazioni antipestose sono due:

1) devono essere efficaci;

2) non devono essere dannose.

Riguardo all'efficacia il *Pfeiffer* affermò che l'immunizzazione ottenuta colla vaccinazione è solo relativa; ma è certo che i vaccinati ammalano in numero minore e meno intensamente.

In quanto ai danni delle vaccinazioni è fatto assodato, che in molte persone si ha una forte reazione.

Secondo il *Bannermann* [2] due questioni sono molto importanti per la pratica delle vaccinazioni antipestose.

1) È senza danno vaccinare nel periodo d'incubazione della malattia?

2) Quando comicia e quanto tempo dura l'immunità?

È noto come il *Calmette*, nel Congresso internazionale d'igiene e demografia a Parigi nel 1900 affermò che, inoculato il vaccino antipestoso nel periodo d'incubazione, la malattia veniva considerevolmente aggravata, come a lui risultava da esperienze fatte nel Laboratorio per le ricerche sulla peste a Bombay.

Il *Calmette* [3] infatti potè assodare che gli animali inoculati con culture di peste non capaci di ucciderli, soccombevano a una tipica infezione pestosa, se appena dopo l'inoculazione del materiale infettante venivano vaccinati con culture morte.

Il *Bannermann* crede di potere mettere in dubbio questo dato dell'esperimento colle statistiche delle vaccinazioni sull'uomo. Egli infatti comincia col far notare che la mortalità nei vaccinati è del 43 %, mentre nei non vaccinati è del 73 %; ora, osserva il *Bannermann*, se si tiene presente che tutti i medici

(1) Aufzeichnung über die am. 19 u. 20 Oktober 1899 im Kaiserlichen Gesundheitsamte abgehaltene wissenschaftliche Besprechung über die Pestfrage Centr, f. Bakt. Bd. XXVI. 1899.

(2) *Bannermann*.-Some aspects of plague inoculation. Centr. f. Bakt. Bd. XXIX.

(3) *Calmette e Salimbeni*. — La peste bubonique. Etude de l'épidemie d'Oporto 1899 — Annales Instit. Pasteur 1899.

nelle Indie inoculano il vaccino *Haffkine* in tutte quelle persone che maggiormente furono esposte all'infezione (1), se l'opinione del *Calmette* fosse vera, la mortalità dovrebbe essere maggiore nei vaccinati che nei non vaccinati.

A sostegno della sua teoria l'autore riporta anche l'opinione del Dr. *Ashburton Thompson*, (2) il quale nota come dei vaccinati 13 ammalarono di peste, ma mostrarono un' infezione leggera. Il *Bannermann* quindi afferma che le persone vaccinate durante l' incubazione della malattia non sono affatto aggravate.

A questo proposito è bene ricordare come i medici indiani vaccinarono anche le persone sospette d'aver preso l' infezione riferendosi all'opinione espressa dall' *Haffkine*, che l' immunità si manifesta già dopo 24 ore dall' inoculazione delle culture morte.

Il *Tidswell* (3) afferma che colla linfa vaccinica *Haffkine* furono vaccinate molte migliaia di persone e tra queste 6 sole ammalarono di peste.

Il *Kossel e Frosch* (4) dichiarano che nella epidemia di peste scoppiata nel 1899 ad Oporto le vaccinazioni all'*Haffkine* non poterono essere praticate su larga scala per le opposizioni della popolazione verso tale pratica. Nessun giudizio quindi fu possibile sulla loro efficacia.

Il *Deutmann* (5) in un lavoro eseguito sotto la direzione del *Calmette* a Lilla, consiglia in una importazione dell'epidemia pestosa, di vaccinare tutte le persone sospette di essere infettate e isolarle. Egli d'altronde nota gl'inconvenienti delle vaccinazioni *Haffkine*, di cui i principali sono:

1) l' incostanza del vaccino;

(1) *A. M. Corkton.*-Report an antiplague inoculation work in the Dharwar. District Bombay — Gouvernement Central Press 1899.

(2) *Askburton Thompson.* — Report on an outbreak of Plague at Sydney 1900.

(3) *Tidswell.* — Some practical aspects of the plague at Sydney (Iourn, of the Sanitary Institute) — London Vol. XXI p. 549.

(4) *Kossel und Frosch.* — Ueber die Pest in Oporto. Arb. aus d. kais. Gesundheitsamte Bd. XVII 1900.

(5) *Deutmann.* — De Pest Vaccinalie en Serotherapie een kritisch experimenteele studie. (Inaug. Diss.) Amsterdam 1890. Ref. Centr. f. Bakt. Bd. XXIX.

2) la tardiva comparsa dell' immunità, che è preceduta da un aumento di suscettività verso l' infezione.

Al vaccino *Haffkine*, il *Deutmann* preferisce il vaccino *Calmette*, che consiste in culture di peste seccate e che permette un più esatto dosaggio. Secondo il *Deutmann* il vaccino *Calmette* ha maggiore potere immunizzante: ma una completa immunità non compare prima dei 10-12 giorni.

In una pubblicazione il *Kolle* (1) riferisce su alcune ricerche da lui fatte sul bacillo delle peste nella sezione speciale annessa al Laboratorio delle malattie infettive di Berlino per gli studi sulla peste, quando nell'estate del 1899 la peste minacciava di prendere vaste proporzioni ad Oporto.

Il *Kolle* al vaccino *Haffkine* (cultura in brodo di 30 giorni) preferisce le culture su agar di 2 giorni emulsionate in brodo e riscaldate per un'ora a 65° (vaccino della commissione tedesca). Egli afferma che con un poco di esercizio in 6 ore di lavoro si possono preparare 1200 dosi di vaccino. Il *Kolle* giudicando dal grado di intorbidamento tra una cultura in brodo e l'emulsione nello stesso liquido di una cultura su agar, nota, come la quantità di corpi bacillari contenuta nella cultura in brodo sia molto minore di quella contenuta in una cultura su agar.

Anche nella peste del 1901 a Bombay, secondo *l'Hahn* (2) le vaccinazioni antipestose *Haffkine* hanno dato buoni risultati. Sembra che esse non solo conferiscano all'uomo una certa immunità, ma contribuiscano anche ad abbassare le cifre della mortalità.

Nelle loro ricerche *Wurtz e Burges* (3) provarono l'azione del vaccino *Haffkine* sui topi bianchi. Dai loro esperimenti risultò, che la mortalità negli animali vaccinati si comportò rispetto a quella degli animali non vaccinati, come 72 % a 94 %. Gli animali

(1) *Kolle.* — Bericht über die Thätigkeit in der zu Studien über Pest eingerichteten Station des Instituts für Infektionskrankheiten (Berlin) 1899 1900 - Zeits. f. Hyg. Bd. XXXVI. 1891.

(2) *M. Hahn.* — Ueber einige Beobachtungen während der diesjährigen Pestepidemie in Bombay. — Berliner medic. Gesellschaft. — Sitzung 26 luni 1901.

(3) *Wurtz et Bourges.* — Recherches expérimentales sur l'immunitè conférèe par le vaccin de Haffkine. Archiv. de med. exp. XIV 1902.

vaccinati vissero in generale più di quelli non vaccinati. I risultati furono migliori se la vaccinazione fu ripetuta più volte.

L'Unico lavoro sperimentale di controllo sull'azione dei diversi vaccini antipestosi lo dobbiamo a *Tavel, Krumbein e Glücksmann* (1) dell' istituto vaccinogeno e sieroterapico di Berna.

Gli autori hanno sperimentato sui ratti e sulle cavie col vaccino *Haffkine*, col vaccino della Commissione tedesca e col vaccino *Lustig*.

Ecco in breve i risultati a cui essi sono arrivati:

a) *Vaccino Haffkine.*

Con questo vaccino e con una sola inoculazione di 5 cmc. di esso infettando l'animale nel peritoneo dopo 10 giorni con un' ansa di platino di cultura virulenta, si ottenne la completa immunizzazione in un sol ratto. Nelle cavie invece non si ottenne in nessun caso una completa immunizzazione: si ebbe solamente un ritardo nella morte e in alcuni casi una forma cronica d'infezione pestosa (1 caso su 11 animali).

b) *Vaccino della Commissione tedesca.*

In due ratti si ottenne un' immunizzazione assoluta. Di 6 cavie invece vaccinate ed infettate di peste nessuna divenne completamente immune: una mostrò la forma cronica di peste e tre un ritardo nell'esito fatale rispetto ai controlli.

c) *Vaccino Lustig.*

Di nove ratti immunizzati ed infettati in tre si ebbe una immunità assoluta: in 16 cavie invece non si ottenne in nessun caso una immunità completa: nella maggior parte di questi animali fu solo notato un ritardo nell'esito fatale.

Quantunque i migliori risultati li abbia dato il vaccino della commissione tedesca, il *Tavel* e i suoi collaboratori affermano che coi vaccini *Haffkine, Lustig* e della Commissione tedesca è possibile immunizzare i ratti verso l' infezione pestosa: ma non è possibile immunizzare la cavia.

(1) *Tavel, Krumbein, Glücksmann.* — Ueber Pestschutzmaassregeln. Zeits. f. Hyg. Bd. XL 1902.

Il *Mercatelli* (1) in una nota preventiva rileva gl' incovenienti delle vaccinazioni antipestose seguendo il metodo delle inoculazioni sottocutanee. In generale si trova una grande opposizione negl' individui da vaccinare, che mal volentieri, nello stato di sanità, si assoggettano a questa pratica, la quale dà sempre una notevole reazione locale e generale.

Partendo da questo concetto, il *Mercatelli* ha studiato dal lato sperimentale, se, nelle vaccinazioni antipestose, alla via sottocutanea potesse essere sostituita la via gastrica. Egli quindi ha stabilito delle esperienze sulle cavie per vedere se l' ingestione di *boli vaccinici* di linfa *Haffkine* avessero effetti immunizzanti. Le ricerche sperimentali del *Mercatelli* aspettano ancora un ulteriore sviluppo, specialmente per ciò che riguarda la tolleranza verso forte dosi di vaccino somministrate per la via gastrica, tenuto conto dell'azione locale di detto vaccino sulla mucosa gastro-enterica.

I metodi di vaccinazione contro la peste finora menzionati, quatunque differente l' uno dall'altro, hanno tuttavia questo di comune, che il vaccino è preparato dal bacillo pestoso ucciso.

Contro l' uso delle culture morte nella vaccinazione antipestosa si levano recentemente il *Kolle e l'Otto.* (2) Essi cominciano col notare che il problema dell' immunizzazione attiva verso la peste, non è ancora risoluto, quantunque molte migliaia di persone sieno state vaccinate in India e notevoli risultati si sieno avuti nelle ricerche sperimentali.

Da numerose esperienze fatte sugli animali, che gli autori promettano di pubblicare al più presto possibile sullo Zeitschrift für Hygiene, risulta che colle culture morte non è possibile di ottenere un' immunità completa. Tale immunità si ottiene invece coll' uso di culture vive attenuate, rese avirulente.

Il punto di partenza per queste ricerche ebbe origine dalle osservazioni che il *Kolle* e *Otto* fecero su una vecchia cultura di peste

(1) *Mercatelli.* — Sulla vaccinazione antipestosa per via gastrica. Riforma medica 1902.

(2) *Holle u Otto.* — Die aktive Immunisierung gegen Pest mittels abgeschwächter Kulturen — medic. Woch. 1903 n. 28.
Untersuchungen über die Pest — Immunität Zeitschr. f. Hyg. XLV 1903.

per molto tempo conservata in Laboratorio. Con questa cultura furono inoculate sottocute 6 cavie. Si svilupparono dei tipici bubboni, che dopo 8-9 giorni si rammollirono e si ruppero verso l'esterno. Il pus che fuoruscíva mostrò scarsi bacilli della peste. Gli animali guarirono. In altri 12 animali infettati più tardi colla stessa cultura, il processo decorse nel medesimo modo.

Questi 18 animali furono infettati con bacillo pestoso virulento dopo 2, 3, 8, mesi e si mostrarono del tutto immuni. Anche dopo l' inoculazione di $^1/_4$ di ansa di una cultura di peste di cui $^1/_{100}$ di ansa era sufficiente a uccidere in pochi giorni una cavia; di questi 18 animali 8 restarono in vita.

Coll' uso quindi di culture viventi attenuate riuscì agli autori di conferire una completa immunità alle cavie: ciò che non era finora riuscito di ottenere coll' uso di culture morte, anche se le inoculazioni furono ripetute più volte.

Gli autori, coltivando per lungo tempo a 40-41° una cultura di peste avuta dal *Maassen* e da questo attenuata artificialmente con un processo ad essi ignoto, poterono indebolirla ancora di più. Inoculata questa cultura nella dose di 3 anse, vale a dire più che 3 mila volte la dose mortale di una cultura virulenta, sotto cute o nel peritoneo, non produceva nelle cavie nessuna alterazione.

Queste culture viventi attenuate fino al punto che hanno perduto ogni potere patogeno, rappresentano secondo gli autori un vaccino nel vero senso della parola. Con una sola inoculazione sottocutanea di piccole quantità di cultura pestosa vivente, ma avirulenta, è possibile conferire con sicurezza una completa immunità verso l'infezione pestosa.

E qui è bene ricordare come l'*Albrecht e Gohn* (1) su 31 campioni di bacilli di peste che da Bombay portarono a Vienna e che per 114-116 giorni avevano sempre coltivato su terreni artificiali (6-7 passaggi) ne trovarono 4, che possedevano una leggera virulenza, senza che gli autori potessero trovare una

(1) *Albrecht u. Gohn.* — Ueber die Beulenpest in Bombay im Iahre 1897 Denkschr. d. mat. nat. Classe d. k. k. Akadem. d. Wissenschaften Wien Bd. 66 1898.

spiegazione soddisfacente di questo fatto. Con queste culture vive, ma debolmente virulenti, riuscì agli autori di conferire ai ratti, (bianchi e grigi) alle cavie e ad altri animali sensibilissimi per la peste una completa immunità; sicchè questi animali sopportarono senza alcun danno l' inoculazione anche intraperitoneale di dosi abbastanza rilevanti di culture di bacillo pestoso virulentissimo.

Anche il giapponese *Hata* (1) afferma di aver ottenuto nei ratti e nelle cavie una completa immunizzazione coll' uso di culture di debole virulenza. L' immunizzazione dei topi riuscì più difficile.

II. Vaccini antipestosi.

Come risulta dalla rapida esposizione che abbiamo fatto delle ricerche più importanti sulle vaccinazioni verso l' infezione pestosa, i prodotti usati come vaccini sono stati diversi. È opportuno accennare qui al modo con cui questi diversi prodotti furono ottenuti ed usati.

a) *Linfa vaccinica Haffkine.*

Il vaccino *Haffkine* fu il primo ad essere adoperato nell' uomo. Ecco come l' *Haffkine* preparò la sua linfa vaccinica nel Laboratorio per le ricerche sulla peste « Plague Research Laboratory » situato a Bombay nel cosidetto vecchio palazzo del Governo.

Un chilo di carne magra di capra venne ridotta in piccoli pezzetti in un trita-carne, quindi emulsionata in 125 gr. di acido cloridrico e lasciato a digerire in autoclave per parecchie ore sotto la pressione di 3 atmosfere. Si forma in tal modo una massa spessa, oleosa, torbida, gialliccia. Si filtra e si diluisce coll'acqua nella proporzione voluta, perchè nel brodo che ne vien fuori, vi sia l' 1 $^0/_0$ di contenuto in albumina. Secondo l' *Haffkine* per ottenere questa proporzione bisogna, aggiungere di acqua circa sette volte il volume della primitiva massa di carne digerita in acido cloridico. Questo brodo è neutralizzato con carbonato di

(1) *Hata.* — Immunität mittelst lebender Pestbacillen (giapponese) — Ref. Centr. f. Bakt. XXXIII $^{17}/_{18}$.

potassa e vi si aggiunge cloruro di sodio, nella proporzione del 0,75 $^0/_0$ e quindi si sterilizza di nuovo.

Questo brodo viene versato in palloni di circa 20 cm. di diametro. In ogni pallone si versano litri 2 $^1/_2$ di brodo, così si ha una grossa soperficie esposta all'aria.

Per costringere i bacilli della peste a vivere sulla superficie, si fanno cadere nel liquido nutritivo delle gocce di olio di olivo o di burro fuso, che per propria natura galleggiano su di esso. A queste gocce di olio aderiscono bacilli i quali sviluppandosi da questi punti fissi, formano come una pellicola sulla superficie del brodo e si approfondano nello spessore del liquido stesso in forma di « stalattiti ».

Questi palloni sono infettati con bacillo pestoso virulento ricavato dal topo: e sono lasciati a sviluppare per 6 settimane in termostato a 30°, agitandoli ogni 2 giorni, per far si che sempre nuovi bacilli si sviluppino sulla superficie, finchè il terreno nutritivo lo permetta.

Compiutosi lo sviluppo, si uccidono i bacilli pestosi, tenendo i palloni per parecchie ore alla temperatura di 65°: vi si aggiunge dopo acido fenico al $^1/_2$ per cento e si controlla la sterilità, facendo cadere delle gocce di brodo direttamente su tubi di agar a becco di clarino. Dopo che la sterilità è stata stabilita senza alcun dubbio sopra una serie di palloni, si riunisce il contenuto di questi in un grosso recipiente.

Dopo aver bene agitato, questa linfa vaccinica viene imbottigliata con ogni cautela in boccette di 30 cmc. di capacità. E così è pronta per l' uso.

La dose di vaccino antipestoso così costruito da adoperarsi nell' uomo fu prescritta dall'*Haffkine* in quantità variabile da 3-5 cmc. a 25 centimitri cubici.

Nella preparazione del suo vaccino l' *Haffkine* partì dal presupposto, che le sostanze immunizzanti non solo fossero contenute nei corpi bacillari, ma anche nella parte liquida delle culture in brodo. Egli anzi affermò, che la migliore composizione del vaccino antipestoso è quella in cui il sedimento batterico e il soprastante liquido si trovano in esso « nella proporzione

in cui questi elementi sono ottenuti nel processo di preparazione da lui adoperato ».

b) *Vaccino della Commissione tedesca.*

La opinione dell' *Haffkine* fu combattuta dalla Commissione tedesca inviata a Bombay per lo studio della peste.

La commissione tedesca dimostrò infatti, come le sostanze immunizzanti del bacillo pestoso si trovino esclusivamente nei corpi bacillari e che i filtrati di culture in substrati liquidi non esercitano, inoculati negli animali, nessuna azione protettiva. Nè basta. Per anologia con quanto è stato stabilito per il tifo ed il colera, la *Commissione tedesca* ritenne, che quanto più le culture di peste erano recenti, tanto maggiore era la quantità di sostanze immunizzanti in esse contenute.

Partendo da questi concetti la *Commissione tedesca* sostituì, nella preparazione del vaccino antipestoso, alle vecchie culture in brodo, secondo il procedimento *Haffkine*, culture su agar di 2-3 giorni.

Ecco in breve come la Commissione tedesca procedette alla preparazione del vaccino antipestoso.

Come materiale infettante fu usata una cultura di bacillo pestoso virulentissima, mantenuta tale mediante ripetuti passaggi nel topo. Con una grossa ansa di platino fu trasportato materiale in abbondanza su agar solidificato a becco di clarino in tubi di grandi dimensioni. Dopo aver lasciato sviluppare le culture in termostato alla temperatura di 35° per 2-3 giorni, in modo da aversi una grossa patina; fu raschiata questa patina ed emulsionata in brodo: indi fu sterilizzata per un'ora a 65° e, dopo constatata la perfetta uccisione del bacillo pestoso, vi si aggiunse acido fenico al $^1/_2$ per cento.

La dose da adoperarsi per le vaccinazioni nell'uomo, fu stabilita dalla Commissione tedesca - come limite minimo - in una cultura su agar di 2-3 giorni emulsionata in brodo e sterilizzata per un'ora a 65°. È inutile qui ricordare che fu questa la dose di vaccino con cui i membri della Commissione tedesca conferirono, mediante una sola inoculazione, un' immunità assoluta ai macachi (macacus radiatus).

Preparando il vaccino antipestoso col suo metodo la Commissione tedesca credette di aver raggiunto i seguenti scopi:

1) una maggiore efficacia; *a*) per l'uso di culture fresche in cui era evitata l'azione macerante, che il brodo eventualmente può esercitare per più settimane sui corpi bacillari, alterando le labili sostanze immunizzanti in essi contenute; *b*) per il maggiore contenuto di corpi bacillari del vaccino così preparato:

2) un migliore dosaggio del vaccino;

3) il potere apprezzare con maggior sicurezza la virulenza del bacillo adoperato.

e) *Vaccino preparato nel Laboratorio di Pianosa.*

La preparazione del vaccino-antipestoso, secondo il metodo della Commissione tedesca, non solo offre grandi pericoli per i preparatori; ma richiede molto tempo e molto lavoro, anche se si ricorre alla modificazione adottata nell'Istituto vaccinogeno e sieroterapico di Berna, facendo cioè sviluppare il bacillo pestoso sull'agar solidificato in grosse *Erlenmeyer* e calcolando per ogni dose di vaccino 10 centimetri quadrati di superficie.

Per rendere più spedite le operazioni e minori i pericoli inerenti alla produzione del vaccino antipestoso, il prof. *Gosio* credette opportuno di adottare nel Laboratorio di Pianosa il seguente procedimento per la preparazione di detto vaccino. Si versa il brodo nelle *Fernbach* in tale quantità da riempire appena con uno strato sottilissimo di liquido nutritivo il fondo del vaso. Queste *Fernbach* sono infettate con bacilli pestosi virulentissimi, mantenuti tali mediante ripetuti passaggi attraverso i ratti. Si lasciano sviluppare le culture per 3-4 giorni in termostato alla temperatura di 30°-35°. - Si raccoglie il contenuto di diverse *Fernbach* in un grosso pallone e si sterilizza per un'ora a 65°.

Dopo aver controllata la sterilità del vaccino nel modo più assoluto, mediante culture in agar e brodo e mediante l'inoculazione negli animali (cavie e ratti), vi si aggiunge l'acido fenico alla proporzione del $^1/_2$ $^0/_0$: si agita ben bene e si divide il liquido in bottiglie della capacità di 10 cmc. chiuse alla fiamma.

È ozioso far qui osservare che tutte queste operazioni vanno eseguite con molte cautele e colle piu severe norme di asepsi, per evitare accidentali inquinamenti.

Con questo metodo di preparazione si ottiene un vaccino antipestoso ricavato da culture fresche e con un contenuto di corpi bacillari molto superiore di quello che si ha usando il procedimento originale dell'*Haffkine*.

La dose da inocularsi nell'uomo fu stabilita come limite minimo in 1 centimetro cubo.

Il vaccino di Pianosa ebbe il suo battesimo pratico nel 1901 nell'epidemia pestosa di Napoli e diede ottimi risultati.

d) *Vaccino Terni-Bandi.*

Per la storia dei vaccini antipestosi, riferiremo anche il modo di preparazione del vaccino proposto dal *Terni* e *Bandi*

Nel peritoneo di una cavia o di un coniglio s'inoculano, secondo il peso dell'animale, diverse quantità di brodo di *Löffler* in cui è emulsionata una piccola quantità di cultura virulentissima di peste su agar. Si produce in tal modo una peritonite pestosa che uccide l'animale in 36-48 ore. Appena dopo la morte, o meglio uccidendo l'animale in agonia, si raccoglie l'essudato peritoneale e, se questo è denso, si diluisce con soluzione fisiologica. Questo essudato, ricco in bacilli pestosi, leucociti e cellule endoteliali, si lascia per 12 ore nel termostato a 37° per ottenere un maggiore sviluppo di germi.

Dopo essersi assicurati che nell'essudato non sieno capitati germi estranei, mediante il procedimento delle culture, si sterilizza tale essudato al calore frazionato, lasciandolo per 2 giorni di seguito per 2 ore alla temperatura di 50°-52°.

Si aggiunge soluzione acquosa di acido fenico al 0.5 $^0/_0$ carbonato di sodio al 0.25 $^0/_0$ e cloruro di sodio al 0.75 $^0/_0$ in dosi diverse, secondo la quantità del materiale solido contenuto nell'essudato.

Nella preparazione in grande gli autori aggiungono a questo essudato culture di bacilli pestosi su agar o la parte solida di culture in brodo, in tale proporzione da ottenere un liquido che

contenga circa due miligrammi di proteine in un centimetro cubico.

Non è il caso che noi ci fermiamo qui a discutere se questo vaccino risponda agli scopi voluti dagli autori; *a*) una rapida comparsa dell'immunità: *b*) una più sicura e notevole immunizzazione degli animali. Noi osserveremo solo, che gli esperimenti pubblicati dagli stessi autori soddisfano poco, e che teoreticamente non sappiamo trovare nessuna ragione seria, basata sui fatti, che possa giustificare l'opinione degli autori, che un vaccino preparato in tal modo sia capace di conferire agli animali una immunità passiva.

Tutti gli autori inoltre (*Lustig*, *Kolle* ecc.) sono concordi nel ritenere, che questo metodo di preparazione del vaccino antipestoso non può avere una pratica applicazione per le seguenti ragioni:

1) per i grandi pericoli inerenti alla sua preparazione;

2) per la grande difficoltà di avere un prodotto sterile e di mantenerlo tale;

3) l' impossibilità di dosare esattamente le sostanze immunizzanti in esso contenute;

4) per il suo costo maggiore. Difatti, osserva giustamente il *Lustig*, se una cavia basta per 20-30 vaccinazioni, quante cavie sarebbero necessarie per la preparazione di migliaia e migliaia di dosi? e quanto personale? e quanti pericoli e quante cure per la custodia di tanti animali infettati di peste, che richiedono un impianto speciale di stalle, gabbie, disinfezioni ecc.? E pensare che il solo Laboratorio di Bombay, esclama il *Lustig*, ove il prezzo della materia prima è minimo, la preparazione semplicissima della linfa *Haffkine* costa al Governo indiano 300 rupie al giorno (540 franchi)!

e) *Vaccino Lustig-Galeotti.*

Partendo dal concetto che le sostanze immunizzanti del bacillo pestoso sono intimamente legate ai corpi bacillari, il *Lustig*, e *Galeotti* hanno preparato un vaccino antipestoso, estraendo con processo chimico le sostanze immunizzanti dai corpi batterici. Per estrarre la sostanza vaccinante dai corpi bacillari gli autori, dopo molte ricerche, hanno dato la preferenza al seguente procedimento.

Il bacillo pestoso è coltivato in grosse scatole di vetro del diametro di 25 cm., in cui si versa dell'agar in uno strato di 5-6 milimetri. Si lascia sviluppare per 24 ore in termostato a 37° si raschia la patina di cultura formatasi sulla superficie e si porta in una soluzione di potassa caustica a 0.75 %. Le masse bacillari si lasciano in questa soluzione di potassa per 12-24 ore alla temperatura di 10°-12°. Il liquido diventa in questo frattempo mucilagginoso ed opalescente: al fondo del vaso resta un piccolo sedimento. Si filtra attraverso uno spesso strato di carta coll'aiuto della pompa ad aria.

Al filtrato si aggiunge acqua distillata. Si versa in bicchieri a calice e si aggiunge a saturazione acido acetico all' 1 %. Si forma un precipitato bianco, fioccoso, che si raccoglie al fondo del bicchiere, mentre il liquido soprastante resta limpido. Si versa la parte liquida ed il precipitato viene raccolto sul filtro e lavato con acqua distillata sterile, fino a quando il filtrato ha reazione neutra.

Si raccoglie questo precipitato dal filtro, si porta in una capsula e si lascia seccare al vuoto. La massa seccata viene polverizzata e rappresenta una sostanza bruno-chiara, che si conserva inalterata per lungo tempo.

Questa sostanza, che costituisce il vaccino *Lustig-Galeotti*, prima di essere usata viene sciolta in una soluzione all' 1 fino al 2 % di carbonato di sodio calcinato.

La dose normale per una vaccinazione in un uomo è di 0. 0133 grammi di sostanza secca polverizzata.

Piccole modificazioni nella preparazione del vaccino Lustig ha apportato il *Dessy* (1), il quale trovò più comodo far sviluppare il bacillo della peste sulll'agar solidificato sopra uno dei lati di boccette quadrate.

Nell'Istituto vaccinogeno e sieroterapico di Berna si è inoltre cercato di combinare insieme la preparazione del vaccino antipestoso secondo *Haffkine* e secondo *Lustig*.

Si preparono culture in brodo di bacillo pestoso e si lasciano

(1) *Dessy*. - Intorno alla preparazione del vaccino e del siero antipestoso con il metodo Lustig-Galeotti. Morgagni n. 9. 1901.

sviluppare per un mese secondo il metodo di *Haffkine*. Indi si sterilizzano col calore queste culture in brodo e vi si aggiunge a saturazione solfato d'ammonio. Si ottiene così un precipitato che viene lavato sul filtro e sciolto in una soluzione all' 1 % di potassa caustica. Vi si aggiunge acido acetico all'1 % e poche gocce di acido cloridrico e si ottiene di nuovo un precipitato. Si lascia sedimentare questo precipitato, si raccoglie e si lava con acqua distillata, fino a quando l'acqua che filtra ha reazione neutra. Si raccoglie ciò che resta sul filtro, si porta in una capsula, si secca al vuoto e si polverizza.

I risultati ottenuti col vaccino preparato in tal modo non furono soddisfacenti : e quindi non v'è nessuna ragione che debba far preferire questo procedimento, a quello usato dal *Lustig*.

Colla preparazione del vaccino antipestoso secondo *Lustig-Galeotti* si ottengono senza alcun dubbio i seguenti vantaggi :

1) esatto dosaggio della sostanza immunizzante ;

2) possibilità di conservare il vaccino anche per lungo tempo, senza che esso perda della sua efficacia ;

3) procedimento meno pericoloso degli altri, rapido e non meno economico ;

4) sicurezza di ottenere un prodotto innocuo, nel senso che gli agenti pestosi sono completamente scomparsi.

Ad ogni modo a questo preparato furono mossi parecchi appunti :

1) difficoltà di ottenere un prodotto sterile.

Lo stesso *Lustig* riconosce tale difficoltà e propone di filtrare attraverso la candela di porcellana la soluzione sodica della sostanza secca prima di inocularla nell'uomo.

2) possibilità che le manipolazioni chimiche indeboliscano od alterino le labili sostanze immunizzanti.

f) *Vaccino Calmette.*

Il vaccino antipestoso secondo il metodo *Calmette* si prepara nel seguente modo. Si seccano direttamente le culture su agar, o si filtrano le culture in brodo e ciò che resta sul filtro si

lascia seccare. La massa ottenuta si polverizza e si conserva in tubi chiusi alla fiamma.

Questa polvere può essere facilmente pesata. Prima di usarla si scioglie nelle volute proporzioni.

A nessuno sfuggirà, come la preparazione del vaccino secondo questo metodo sia estremamente pericoloso. Il vaccino antipestoso *Calmette* quindi non è destinato ad avere pratica applicazione.

g) *Vaccino Besredka.*

Per scopi speciali su cui diremo in seguito, il *Besredka* (1) ha proposto l'uso di un vaccino preparato nel modo seguente.

Si fa sviluppare il bacillo pestoso per 48 ore sull' agar. Si raschiano le culture e si emulsionano in soluzione fisiologica di cloruro di sodio: quindi si sterilizzano mediante il riscaldamento per 1 ora a 60° a bagno maria.

L'emulsione di batteri pestosi in soluzione fisiologica si versa, facendola cadere dolcemente lungo le pareti, in un vaso cilindrico contenente del siero antipestoso dotato di forte potere agglutinante. Si formano così due colonne ben distinte: il siero in basso i batteri in alto. I batteri dello strato inferiore che toccano il siero, in seguito a qualche tempo si riuniscono in ammassi fioccosi sempre più grossi e cadono al fondo del vaso. A poco a poco tutti i batteri subiscono la stessa sorte, in modo che dopo 12 ore tutti si trovano precipitati al fondo del vaso e il liquido sovrastante diventa limpido. Quest'ultimo è decantato: il deposito batterico è accuratamente lavato con soluzione fisiologica di cloruro di sodio fino alla scomparsa del siero.

La massa così ottenuta è di consistenza pastosa, semiliquida, bianca, che dà con addizione di soluzione fisiologica un'emulsione fina ed omogenea.

Vedremo in seguito quali preprietà attribuì l'autore a questo suo vaccino antispestoso.

(1) *Besredka.* - De l'immunisation active contre la peste, le choléra et l'infection typhique - *Ann.* Instit. Pasteur 1902

h) *Vaccino Kolle.*

Il vaccino antipestoso del *Kolle* consiste in una cultura di peste poco attiva resa completamente avirulenta, mediante lo sviluppo alla temperatura di 40°-41° prolungato per parecchie generazioni e per un tempo più o meno lungo.

Il vaccino antipestoso così ottenuto, come bene osserva il Kolle, rappresenta un vaccino nel vero senso della parola; ma esso ha significato esclusivamente teoretico, non potendo avere una pratica applicazione nelle vaccinazioni dell'uomo.

III. Questioni inerenti ai vaccini antipestosi.

a) *Culture da usarsi.*

Tutti gli autori sono concordi nel ritenere, che le culture di bacillo pestoso da usarsi per la produzione di un buon vaccino, qualunque sia il metodo di preparazione, debbono essere molto virulente. E senza alcun dubbio il desideratum sarebbe di usare culture di peste isolate direttamene dall'uomo. Ora se questa è condizione facile ad ottenersi nelle regioni ove la peste infierisce come infezione endemica (India, alcuni punti d'Africa), non è possibile in Europa, ove essa fa rare e rapide apparizioni. Qui è necessario di mantenere virulento il bacillo pestoso passandolo di tanto in tanto attraverso il corpo di un animale da esperimento.

In generale si è scelto il ratto per tali passaggi. Lo scopo di questi passaggi dovendo essere quello di mantenere il bacillo pestoso virulento per l'uomo, è naturale che si scegliesse per essi un animale, che ha tale importanza nell'ipidemiologia della peste, da farlo ritenere da alcuni autori il medium quasi indispensabile perchè la peste si propaghi da uomo a uomo. Questo dato epidemiologico rappresenta certo una prova che il bacillo pestoso attraversando il corpo dei ratti (o dei topi) non perde la sua virulenza per l'uomo.

E in questo senso la scelta dell'animale per mantenere virulento il bacillo della peste è della più grande importanza,

perchè la virulenza di un microorganismo non è assoluta, ma è sempre relativa verso un dato animale. Nè basta. Il passaggio ripetuto e continuato di un batterio attraverso una specie di animali eleva sempre la virulenza di questo batterio verso questa stessa specie; mentre in alcuni casi l' abbassa notevolmente per altre specie. Cosi per es., il bacillo del mal rosso dei suini passato attraverso i conigli (*Pasteur*) [1] o attraverso i topi (*Prettner*) [2] diventa avirulento per i porci: il virus rabido passato attraverso i conigli diventa virulentissimo per questo animale (virus fixo), ma perde la sua virulenza per l'uomo (*Marx*); [3] dalle ricerche di v. *Behring*, [4] *Knorr*, [5] v. *Lingelsheim*, [6] *Petruschky*, [7] e altri risulta che gli streptococchi virulentissimi per i topi, dopo moltissimi passaggi attraverso i conigli mostrano una grande virulenza per questi animali e perdono la loro infettività per i topi: viceversa gli streptococchi virulentissimi per i conigli perdono ogni potere patogeno per questi animali se sono passati per molte volte da topo a topo.

Alcuni autori (*Yersin, Calmette* e *Borrel*) manifestarono l'opinione che la stessa cosa avvenisse per il bacillo della peste: e che quindi esso mediante il passaggio da animale ad animale acquistasse un'alta virulenza per questa specie di animale, ma perdesse la sua azione patogena per animali d'altra specie. Così ritenne l'*Hankin* [8] che la virulenza del bacillo pestoso per l'uomo si attenuasse mediante i ripetuti passaggi attraverso i ratti.

(1) *Pasteur et Thuillier*. - Compt. rend. Acad. d. sciences 26 nov. 1883.

(2) *Prettner*. - Berl. Tierärztliche Wochenschrift 1901.

(3) *Marx*. - Centr. f. Bakt. Bd. 30. 1901.-Deutsche med. Woch. 1899-1900.

(4) *Behring*. - Untersuchungsergebnisse betr. Streptokokkus longus. - Centr. f. Bakt. Bd. XII. 1892.

(5) *Knorr*. - *Exper. Untersuchungen, üb. d. Streptokokkus longus. - Z. f. Hyg. Bd. XIII 1893.*

(6) *v. Lingelsheim*. - Aetiologie u. Therapie d. Streptokokken-Infection. Beitr. z xep Therapie herausg. v Behring 1899.

(7) *Petruschky*. - Untersuchungen über Infection mit pyogenen Kokken - Ztschr f. Hyg. Bd XVII e XIII.

(8) *Hankin*. - La propagation de la peste. - Annales Inst. Pasteur. - 1898.

Il dott. *Otto*, [1] ha sottomesso a ricerche sperimentali tale questione, importante non solo dal lato teoretico, ma anche da quello pratico specialmente per l'epidemiologia della peste, per la produzione ed il controllo del vaccino antipestoso.

L' *Otto* ha passato per 40 volte di seguito lo stesso stipite di bacillo della peste nelle cavie, nei conigli, nei ratti e nei topi ed è arrivato alla seguente conclusione:

Non si può dimostrare un antagonismo riguardo la virulenza del bacillo pestoso per le diverse specie di animali (cavie, conigli, ratti, topi). Passando questo microrganismo per più volte di seguito attraverso i corpi di una delle dette specie, esso non perde la sua virulenza per le altre.

Anche noi, per nostre esperienze istituite da lungo tempo in questo Laboratorio, dobbiamo confermare le idee dell'*Otto*.

Alcuni stipiti di bacilli pestosi, isolati direttamente dal bubbone dell' uomo e coltivati una sola volta in agar ci hanno mostrato una grande virulenza per le cavie, i topi, i ratti e i conigli. Passati alcuni stipiti per lungo tempo sempre e costantemente attraverso i ratti, inoculati alle cavie mostrarono di possedere un'alta virulenza anche per questa specie di animali. E nello stesso tempo uno stipite di bacillo pestoso passato costantemente attraverso la cavia per più di un anno, non perdette la sua alta virulenza per i topi ed i ratti.

Una cultura di peste appena isolata dall'uomo mostrò per la cavia una virulenza se non maggiore, per lo meno eguale a quella dello stipite che da molto tempo era stato passato costantemente e periodicamente attraverso alla cavia.

Da questi fatti risulta che per mantenere nel bacillo pestoso la sua primitiva virulenza per l'uomo la scelta dell'animale non ha quella importanza che potrebbe avere per altri microrganismi. Il topo, il ratto e la cavia si prestano egualmente bene allo scopo.

Abbiamo già detto, che una condizione indispensabile per ot-

(1) *Otto*. - Ueber den Einfluss der Tierpassagen auf die Virulenz der Pestbacillen für die verschiedenen Thierarsten. - Zeitschr. f.Hyg. Bd. XLI 1902.

tenere un buon vaccino antipestoso è quella di adoperare nella sua preparazione una cultura di bacillo virulenta e non attenuata dai ripetuti passaggi sui terreni artificiali.

La Commissione tedesca infatti stabilì delle ricerche per vedere se le culture pestose attenuate da lunga permanenza sui terreni di nutrizione dessero i medesimi risultati delle culture fresche e virulentissime da essa adoperate in tutti gli esperimenti di immunizzazione.

Tre macachi furono inoculati con una cultura su agar di debole virulenza, emulsionata in brodo e riscaldata per 1 ora a 65° e con relativa aggiunta del $^1/_2$ $^0/_0$ di acido fenico. Questi tre macachi 11 giorni dopo l'inoculazione del vaccino così ottenuto furono infettati sotto cute con un'ansa di cultura virulenta di peste. Essi morirono con i sintomi classici di una setticemia pestosa. Col vaccino quindi ricavato da culture attenuate non si produsse nessuna traccia di immunità.

E fu appunto allo scopo di adoperare culture virulentissime, che il *Polverini* per la produzione del vaccino *Lustig* a Bombay, usò culture di peste isolate dalle forme di pneumonite pestosa nell'uomo: perchè pare che il bacillo della peste svilupppandosi nel polmone dell' uomo assuma una forte virulenza (*Polverini*, *Martini* ed altri).

Quì è bene far notare come in generale in altri processi d'immunizzazione (tifo, colera) si attribuì poca importanza alla virulenza dei microrganismi adoperati, nel senso che anche le culture di tenue virulenza fossero capaci, uccise per un'ora al calore di 65°, di conferire agli animali l' immunità attiva. Il bacillo della peste invece si comporta anche sotto questo riguardo in modo diverso. E per ottenere un vaccino antipestoso, capace di conferire l' immunità, è necessario adoperare culture di peste virulentissime isolate direttamente dall'uomo o, se questo non è possibile, mantenute tali mediante il passaggio continuato attraverso il corpo degli animali, generalmente dei topi o dei ratti.

Fu appunto partendo da questo concetto, che la Commissione tedesca abbandonò per la preparazione del vaccino an-

tipestoso le vecchie culture in brodo di *Haffkine* e le sostituì con culture fresche di 2-3 giorni sviluppate su agar.

b) *Modo di uccidere le culture.*

Di grande importanza per ottenere un vaccino antipestoso efficace è il procedimento usato per uccidere il bacillo pestoso.

Abbiamo già notato come i recenti studi del *Kolle* ed *Otto* abbiano dimostrato, come l'ideale di un vaccino antipestoso sia rappresentato da culture attenuate, ma vive e capaci di produrre un' infezione leggera. Ma tale vaccino difficilmente potrà avere una pratica applicazione nell'uomo, perchè l'attenuazione di un germe è sempre relativa ad un dato organismo. Nessuno esperimento diretto potrà mai assicurarci che una cultura di peste resa avirulenta per le cavie e per i ratti, lo sia egualmente per l'uomo, e che si mantenga costantemente tale per tutte le razze, per tutte le età, in tutte le condizioni in cui un uomo può trovarsi (cause debilitanti, malattie concomitanti ecc.).

Non ostante quindi gli splendidi risultati ottenuti dal *Kolle* ed *Otto* e da altri autori sugli animali colle culture viventi rese avirulenti, resta come condizione indispensabile per il vaccino antipestoso da usarsi nell'uomo che i bacilli sieno completamente uccisi.

Lo scopo principale da raggiungere, è di usare per questa operazione un procedimento che uccida sicuramente i germi della peste, danneggiando il meno possibile le labili sostanze immunizzanti contenute nei corpi bacillari.

Nella preparazione del vaccino all' *Haffkine* le culture sono sterilizzate col calore.

La Commissione tedesca stabilì delle ricerche per vedere se fosse possibile uccidere le culture con l'acido fenico e col cloroformio. Da queste esperienze risultò, che l' acido fenico aggiunto alle culture vive di bacillo pestoso distrugge in esso le sostanze immunizzanti : e che colle culture uccise col cloroformio non si hanno risultati migliori di quelli avuti adoperando culture uccise col calore.

Quì è bene tener conto di alcuni nostri tentativi per sterilizzare con altro metodo le culture di peste. Partendo dal fatto asso-

dato in questo stesso Laboratorio dallo *Sbriscia*, [1] che la glicerina alla temperatura di 37° uccide in pochi giorni il bacillo della peste, cercammo di avvalerci di questa proprietà della glicerina per preparare il vaccino antipestoso nel modo seguente. Culture sviluppate per due o tre giorni su agar furono emulsionate in glicerina diluita in acqua sterile (80 p. glicerina 20 p. acqua).

Quest' emulsione fu lasciata per quattro o cinque giorni in termostato a 37°. Il bacillo della peste veniva in tal modo sicuramente ucciso.

Colla quantità di emulsione corrispondente a una cultura su agar inoculammo delle cavie e dei ratti per vedere se nelle culture cosi uccise le sostanze immunizzanti fossero conservate; ma l' azione locale della glicerina ci consigliò subito ad interrompere le nostre ricerche. Nel punto d' inoculazione si formò costantemente una zona più o meno estesa di necrosi dei tessuti, che ci mostrò come il vaccino così ottenuto non potesse avere una pratica applicazione e come fosse ozioso ogni ulteriore studio.

Nella sterilizzazione delle culture col calore sono necessarie molte cautele per ottenere il duplice scopo di uccidere il bacillo della peste e non alterare le sostanze immunizzanti. E in questo senso è importante tener presente il modo di comportarsi del bacillo pestoso e delle sostanze immunizzanti in esso contenute verso l' azione del calore.

Con una serie di esperimenti la Commissione tedesca dimostrò, che mediante l'ebollizione le sostanze immunizzanti del bacillo pestoso vengono distrutte in pochissimo tempo. Quattro macachi inoculati con culture bollite non mostrarono nessuna immunità verso l' infezione pestosa. La commissione tedesca, nella sterilizzazione delle culture, consiglia di non oltrapassare i 65°, avendo potuto provare, come questa temperatura sia innocua per le sostanze immunizzanti contenute nelle culture di bacilli pestosi.

Il *Yersin* e i suoi collaboratori, come anche il *Wladimiroff* [2]

(1) *Sbriscia.* - Sulla depurazione rapida del vaccino antivaioloso. Il Policlinico - 1901 - M.

(2) *Wladimiroff.* - Zur Technick der Pestserumbereitung-Wratsch 1897 Ref. Cent. f. Bakt. 1897

e il *Toptschieff* (1) adoperarono invece il riscaldamento a 58° per un' ora.

A giustificare l' uso di temperature ancora inferiore a 65°, come 58°, 54°, per la sterilizzazione delle culture di peste, sta il fatto, che il bacillo pestoso è molto sensibile al calore umido.

Secondo la *Commissione tedesca*, *Toptschieff* e altri, alla temperatura di 58° il bacillo pestoso muore in meno di dieci minuti, mentre secondo *Abel* (2), si ottiene il medesimo effetto a 50°, in un' ora. Ma i risultati ottenuti da questi esperimenti non possono essere senz' altro applicati alla fabbricazione del vaccino antipestoso.

Nello studio dell' azione delle temperature sul bacillo della peste, gli autori si sono serviti per lo più di scarso materiale contenuto nei capillari e nelle provette. E il *Toptschieff*, contrariamente all' *Abel*, ha rilevato notevoli differenze tra i risultati ottenuti coi tubi capillari e colle provette: nel senso che l' azione del calore sui bacilli contenuti nei capillari è più rapida.

Nella preparazione del vaccino antipestoso si tratta invece di sterilizzare grandi masse bacillari contenute in grossi palloni. Le differenze quindi devono essere ancora maggiori. La Commissione tedesca infatti non manca di far osservare che il riscaldamento dei bacilli della peste per un' ora a 65° sterilizza certamente, se si tratta di piccole quantità.

Il *Gottschlich* afferma che due volte, dopo aver tenuto l' emulsione di 20 culture su agar in 100 cmc. di brodo per un'ora a 65°, trovò che i bacilli pestosi erano ancora vivi. Egli non crede che questi risultati sieno dipesi dalla quantità del liquido da sterilizzare: ma invece dalla concentrazione dell' emulsione. Ciò per analogia di quanto succede con altri batteri e per il fatto, che su otto esperienze due volte il *Gottschlich* trovò nel vaccino bacilli pestosi viventi e in tutti e due i casi si trattò appunto di emulsioni molto concentrate.

A rendere più difficile la sterilizzazione del vaccino antipestoso col calore, concorre senza alcun dubbio il fatto, che il bacillo

(1) *Toptschieff*.-Beitrag zum Einfluss der Temperatur auf die Mikroben der Bubonenpest Centr. f. Bakt. Bd. XXIII. 1898.

(2) *Abel*.-Zur Kenntniss des Pestbacillus - Centr f. Bakt. Bd. XXI. 1897.

della peste forma sull' agar una patina attaccaticcia, la quale si lascia ridurre con grande difficoltà in emulsione omogenea, e che nel brodo esso si sviluppa formando dei fiocchetti, costituiti da accumuli di microrganismi. Ora l' esistenza di tali parti solide nel liquido da sterilizzare, non può non esercitare una certa influenza sul riscaldamento uniforme della massa.

Ad ogni modo quello che a noi importa, è di richiamare l' attenzione sulle cautele che sono necessarie nella sterilizzazione delle culture. Crediamo indispensabile di effettuare il riscaldamento in modo che tutto il liquido contenuto nel grosso pallone sia esposto per un ora alla temperatura di 65°. Ecco il procedimento da noi usato.

Il materiale da sterilizzare, costituito da emulsione in brodo, di culture su agar o da culture sviluppate direttamente in brodo, vien raccolto in palloni di uno o due litri e portato in termostato a 65°. Accanto ad essi si pone un pallone di eguale capacità riempito di acqua. In questo pallone si fa pescare un termometro, in modo che la punta occupi il centro del liquido. Quando questo termometro sale a 65°, si ha la presunzione che anche il materiale da sterilizzare sia uniformemente riscaldato a 65° fin negli strati centrali : si lascia ancora per un' ora nel termostato e quindi si toglie via. Seguendo questa precauzione, noi abbiamo visto che le culture sono sicuramente uccise.

c) *Controllo di purezza.*

Una delle condizioni indispensabili a cui deve rispondere il vaccino antipestoso da usarsi nell' immunizzazione attiva dell' uomo è che sia completamente sterile : sterile nel senso che il bacillo pestoso sia sicuramente morto e che nessuno inquinamento con altri batteri sia avvenuto nelle diverse manipolazioni.

È noto, come nelle Indie ove le vaccinazioni antipestose all' *Haffkine* furono adoperate su vasta scala, si ebbero a deplorare diversi fatti spiacevoli dovuti ad inquinamenti accidentali della linfa vaccinica. Si riscontri in proposito il rapporto della Commissione indiana sulla peste (pag. 187 e seguenti del volu-

me V) e il rapporto sommario del Laboratorio per le ricerche sulla peste a Bombay diretto dall' *Haffkine* (1).

Il metodo usato dall' *Haffkine* per controllare la sterilità della sua linfa fu il seguente. Dopo aver riscaldata la massa di linfa vaccinica per un' ora a 70° e dopo avere aggiunto ad essa il $^1/_2$ % di acido fenico, fece cadere alcune goccie direttamente sull' agar solidificato a becco di clarino.

Noi non crediamo che si possa senz' altro accettare questo metodo di controllo, per le seguenti ragioni:

1) non è prudente il ricorrere al controllo di purezza appena dopo cessata l' azione del calore. E ciò perchè in questo momento potrebbe riescire difficile mettere in evidenza i pochi germi, che eventualmente si fossere sottratti all' azione deleteria del calore e che certamente sono stati da esso danneggiati nel loro potere di accrescimento.

2) niente giustifica l' eseguire detto controllo dopo l' aggiunta di acido fenico. Se l' aggiunta di acido fenico al $^1/_2$ % non uccide i germi capitati nel vaccino, esso ne ostacola e ne impedisce certamente lo sviluppo. Ora, portando direttamente la linfa vaccinica sull' agar solidificato non avviene nessuna ulteriore diluzione e la soluzione fenica resta sempre ad agire come ostacolo allo sviluppo dei germi.

3) il controllo batteriologico non basta. Il *Gottschlich* infatti nota, come egli abbia potuto osservare in due vaccini, che culture su agar restarono sterili, anche prolungando l' osservazione per parecchi giorni, mentre gli animali inoculati con questo vaccino morirono coi sintomi della setticemia pestosa.

Nel controllo di purezza della linfa vaccinica s' impone quindi l' esame batteriologico e l' esame biologico. E perchè tali ricerche sieno circondate da tutte quelle garenzie che la pratica impone, noi siamo soliti di lasciare almeno per un giorno il materiale sterilizzato alla temperatura dell' ambiente, in luogo oscuro, perchè i germi che eventualmente fossero sopravvissuti o capitati accidentalmente in esso, moltiplicandosi, potessero essere più sicuramente messi in evidenza. L' esame batteriologico si pratica,

(1) Summarised Report of the plague Research Laboratory 1902 - 1904.

prima dell' aggiunta di acido fenico, versando poche goccie del vaccino, dopo averlo ben bene agitato, in piastre di agar e in tubi di brodo. Nello stesso tempo s' inoculano con un cmc. di esso ratti e cavie nel peritoneo e sottocute. Vi si aggiunge dopo acido fenico al 0,5 $^0/_0$: e se il risultato del controllo è favorevole, nel senso che, nè all'esame batteriologico, nè all'esame biologico si metta in evidenza inquinamento di sorta, il vaccino è pronto ad essere imbottigliato e messo in uso.

d) *Controllo di efficacia.*

Coll' esame inteso a dimostrare la purezza del vaccino dovrebbe anche accompagnarsi un esame inteso a provare l' efficacia del vaccino medesimo.

L' *Haffkine* per la "*standarizzazione*,, del suo vaccino, come dicono gl' Inglesi, si servì del metodo diretto sull' uomo. Egli con una serie di ricerche istituite su venti pazienti determinò la quantità di vaccino capace di produrre un aumento di temperatura di 39°. E siccome questo metodo non poteva essere applicato nelle grandi spedizioni di vaccino, così nel laboratorio di Bombay per giudicare l'efficacia del medesimo fu adottata la seguente pratica: stabilita l'opacità alla luce del primitivo vaccino controllato sui venti pazienti, « *standard dose* » degli Americani, fu assegnato ai nuovi vaccini un diverso valore, secondo il grado di opacità maggiore o minore che mostravano paragonato a quello del vaccino campione.

Questa dose « *standard* » rappresenta ad ogni modo una quantità arbitraria, che *Haffkine* stabilì in 2 cmc e $^1/_2$.

Il pretendere che per ogni vaccino, prima di metterlo in uso, si stabilisca quale quantità sia necessaria per produrre nell' uomo una temperatura di 39 gradi, estendendo l' osservazione a dieci o venti individui, non è praticamente possibile. È quasi ozioso far notare:

1) la difficoltà di stabilire ogni volta un simile esperimento:

2) la perdita di tempo che spesso potrebbe danneggiare l' esito delle vaccinazioni da eseguire:

3) la grande diversità nel modo di comportarsi dei diversi

individui verso la medesima quantità dello stesso vaccino, fatto, che rende difficile ottenere risultati concordanti e persuasivi.

Se poi questo controllo dovesse essere affidato agli Istituti di produzione, questi si troverebbero nell' assoluta impossibilità di poter tenere per quattro o cinque giorni in osservazione una ventina di individui.

Che tale procedimento sia di non facile e pratica attuazione lo mostra il fatto, che nel Laboratorio di Bombay si ricorse all' opacità del vaccino per giudicarne l' efficacia. Ma nemmeno questo metodo risolve il difficile problema. Prendendo a base del giudizio il criterio dell' opacità, non si può in alcun modo apprezzare l' efficacia di un vaccino : esso ci può solo far giudicare del maggiore o minore contenuto di corpi bacillari in un determinato volume di liquido.

L' efficacia del vaccino antipestoso non dipende esclusivamente dal contenuto di sedimento batterico, quantunque questo ne rappresenti un coefficiente importante. Noi abbiamo già detto, come sull' efficacia del vaccino influisca la virulenza della cultura adoperata, il modo di sterilizzazione, l' azione più o meno prolungata del calore ecc. La valutazione quindi del contenuto batterico non può servire per base ad un giudizio sull' efficacia del vaccino.

La commissione tedesca giudicò dell' efficacia del suo vaccino, prendendo come criterio i risultati ottenuti dalle ricerche istituite sugli animali (macachi).

Certo il metodo migliore per giudicare del valore immunizzante del vaccino antipestoso e il più adatto per un Istituto di produzione, sarebbe la prova sugli animali da esperimento.

La commissione tedesca, come abbiamo già visto, sperimentò sui macachi e stabilì la dose necessaria di vaccino per salvare detto animale dall' infezione prodotta da un' ansa di platino di cultura virulenta inoculata sotto cute.

Sperimentando invece sulla cavie e sui ratti, non si può prendere come criterio di giudizio l' azione immunizzante esercitata dal vaccino su tali animali. Dalle nostre ricerche infatti risulta come questi animali non si comportino tutti nello stesso modo

verso la stessa dose di vaccino per ciò che riguarda la immunità che acquistano verso l'infezione procurata sperimentalmente dalla stessa dose di bacillo pestoso di costante virulenza.

Se si volesse seguire quindi per il dosaggio di un vaccino antipestoso un metodo veramente razionale, cioè quello di provare il grado d'immunità che esso conferisce agli animali da esperimento, si dovrebbe per ogni vaccino istituire una serie di ricerche e fondare il giudizio sulla percentuale degli animali salvati. Questo procedimento non è per conseguenza applicabile nella pratica, perchè richiederebbe un tempo molto lungo e un consumo enorme di animali.

Per il controllo di efficacia del vaccino antipestoso bisogna quindi contentarsi di un metodo approssimativo. Un criterio però non assoluto sull'efficacia di un vaccino, si può ricavare dalla valutazione della reazione che una data dose di esso produce nei piccoli animali da esperimento.

Ecco in linee generali da quali fenomeni è rappresentata tale reazione. Poco tempo dopo l'inoculazione del vaccino antipestoso (costituito da culture uccise col calore) gli animali (ratti e cavie) diventano irrequieti. L'irrequietezza cresce, si hanno tremiti che aumentano sempre più in frequenza, sinchè l'animale è preso da movimenti convulsivi. Esso si abbatte, mostra il pelo arruffato e gli occhi spenti: si eleva la temperatura. Dopo qualche tempo questi sintomi regrediscono e l'animale ripiglia il suo stato normale. Nei primi giorni si ha un notevole dimagrimento e restano i fenomeni locali, consistenti, nelle inoculazioni sottocutanee, in un edema più o meno esteso, che va scomparendo a poco a poco.

Noi crediamo, che, tenendo giusto conto della reazione che un vaccino produce in una cavia o in un ratto, si può avere un criterio sull'efficacia di esso: ma, ripetiamo, questo criterio non è nè rigoroso, nè matematicamente esatto.

A sostegno di questa nostra opinione riportiamo qui i risultati da noi ottenuti in una serie di esperienze istituite con 3 diversi vaccini di differente efficacia.

Vaccino a – Si ottiene emulsionando in brodo delle culture

di peste virulentissime di 2 giorni su agar e lasciando l'emulsione al calore di 80° per 5 - 6 ore.

Colla quantità di emulsione corrispondente a una cultura su agar si inoculano 3 ratti sotto cute, si ha assenza completa di reazione locale e generale: gli animali si mostrano vispi e non dimagriscono.

Vaccino b - Si ottiene emulsionando in brodo le stesse culture su agar di 2 giorni e sterilizzandole esattamente per 1 ora a 60°.

S'inoculano 3 ratti con la quantità di emulsione corrispondente a una cultura di agar, si ha una tipica reazione: edema locale, tremore e movimenti convulsivi, abbattimento dell'animale che giace col pelo arruffato e coll'occhio spento: elevazione di temperatura.

Vaccino c - Ottenuto collo stesso metodo del vaccino *b*, ma usando una cultura di peste isolata direttamente dall'uomo e coltivata per una sola volta in agar.

Con la quantità di emulsione corrispondente a una cultura su agar, si inoculano tre ratti, si ha una forte reazione locale e generale. I sintomi generali sono più intensi e di più lunga durata e l'edema locale si diffonde molto e dura più del solito.

E che l'intensità di reazione sia in ragione diretta del potere immunizzante posseduto da un vaccino, lo mostra il fatto, che, infettati questi ratti colla stessa quantità di bacillo pestoso dopo 10 giorni s'ebbe il seguente risultato.

I tre ratti inoculati col vaccino *a*, che non aveva prodotta nessuna reazione morirono di setticemia pestosa contemporaneamente ai controlli.

Dei tre ratti inoculati col vaccino *b*, che aveva dato una reazione normale, uno si salvò e due morirono 6 - 8 giorni dopo i controlli.

Dei tre ratti inoculati col vaccino *c*, che aveva dato una reazione fortissima, se ne salvarono due e uno morì 10 giorni dopo i controlli.

Dimostrata questa relazione tra la reazione e l'immunizzazione conferita da un vaccino antipestoso agli animali da esperimento:

noi crediamo che sia giustificata la nostra idea di servirci della reazione come criterio per giudicare l'efficacia di un vaccino antipestoso.

Va da sè che anche in questo caso bisogna partire da un punto di paragone: da una reazione standard, direbbero gl' Inglesi. Nella scelta di questa reazione di paragone il ricercatore ha ampia libertà. Noi ci riportiamo sempre alla reazione prodotta da una cultura di 2 giorni su agar, molto virulenta, emulsionata in brodo e sterilizzata per 1 ora esattamente a 65° senza aggiunta di acido fenico al 0,5 %.

In questo genere di apprezzamenti non si possono stabilire limiti netti e precisi: ma bisogna solamente contentarsi di un giudizio approssimativo.

e) *Dosaggio.*

Uno dei problemi che maggiormente ha preoccupato i produttori di vaccino antipestoso, è stato quello di stabilire la dose necessaria da inoculare per ottenere nell'uomo un'azione sicuramente protettiva verso l'infezione pestosa.

L'*Haffkine* per la sua linfa vaccinica stabilì questa dose in cmc. $2^1/_2$ - 3. Ma in seguito egli venne sempre più aumentando la dose da inoculare, che in alcuni casi spinse fino a 25 centimetri cubici.

La Commissione tedesca stabilì come limite minimo da adoperarsi nelle vaccinazioni dell'uomo un'intera cultura di 2 giorni su agar emulsionata in brodo.

Nell' Istituto di Berna il vaccino della Commissione tedesca è preparato in grossi *Erlenmeyer.* La dose per ogni vaccinazione nell'uomo è rappresentata dalla patina di 10 centimetri quadrati.

Per il vaccino da noi preparato a Pianosa abbiamo stabilito come quantità minima da usarsi nell'uomo un centimetro cubico.

Il *Lustig* per il suo vaccino adoperò nell'uomo la dose di gr. 0, 0133 di sostanza secca.

Queste dosi furono stabilite dall' *Haffkine* direttamente con

le osservazioni sull'uomo: dagli altri in base ai risultati ottenuti sui diversi animali da esperimento.

Per ciò che riguarda il dosaggio del vaccino antipestoso, bisogna tenere presente la legge d'indole generale, per cui l'intensità della vaccinazione è in dipendenza:

1) dalla qualità e quantità del vaccino;

2) dal numero delle vaccinazioni;

3) dalla costituzione interna del vaccinato.

Tutti gli autori infatti sono concordi nel ritenere, che una data quantità di vaccino può essere sufficiente per proteggere il ratto e può restare senza effetto per la cavia. La Commissione tedesca dimostrò che una cultura di peste su agar di 2 giorni, emulsionata in brodo e sterilizzata per 1 ora a 65° conferiva una completa immunità ai macachi, ma non bastava per immunizzare gli semnopiteci o scimmie grigie, per cui bisognava adoperare almeno una dose doppia (2 culture) per ottenere una completa immunità.

Oltre quindi a tutte le cause dipendenti dalla qualità del vaccino, vi è anche il modo di comportarsi del soggetto vaccinato, che rende quasi impossibile lo stabilire anche approssimativamente la quantità di vaccino necessaria per ottenere una buona immunizzazione dell'uomo verso l'infezione pestosa. Le dosi quindi adottate sono puramente arbitrarie e scelte per analogia.

Qui è bene osservare come la dose da adoperarsi nelle vaccinazioni è anche in dipendenza della virulenza e dellla quantità del materiale infettante. Maggiore è la virulenza e la quantità del materiale infettante, maggiore deve essere la dose di vaccino da adoperarsi. Ora se nelle ricerche sperimentali sugli animali noi possiamo sempre con ogni sicurezza stabilire la quantità e la virulenza del bacillo pestoso usato per produrre la malattia nell' infezione naturale dell' uomo è questo un dato che si sottrae del tutto alla nostra osservazione. Questa circostanza rende sempre più difficile il dosaggio del vaccino antipestoso da adoperarsi nell' uomo.

Tenuto conto di tutte queste ragioni, lo sforzo di preparare

il vaccino in modo da avere un esatto dosaggio; è restato finora senza una pratica soluzione.

Nè tale soluzione è data dal vaccino *Lustig*. Usando questo vaccino noi siamo sicuri di adoperare sempre la stessa quantità di sostanza secca polverizzata, ma non una quantità sempre eguale di sostanza vaccinante. Lo stesso *Lustig* ha notato il fatto, che, pur seguendo lo stesso metodo, non si ottengono sempre vaccini della medesima efficacia.

Ed infatti, anche adoperando il metodo di preparazione *Lustig*, il vaccino è sottomesso a tutte quelle cause che possono influire sulla sua efficacia (virulenza della cultura, manipolazioni chimiche ecc.).

Allo stato attuale delle nostre conoscenze siamo quindi ben lontano dal possedere un vaccino antipestoso ideale, che possa essere esattamente dosato. Bisogna per conseguenza ricorrere a dosi arbitrarie, stabilite per analogia, tenendo sempre presente le due condizioni indispensabili a cui un vaccino antipestoso deve rispondere, cioè:

1) deve essere efficace;

2) deve essere innocuo.

Un vaccino può perdere la sua seconda qualità e di venire dannoso, se è inoculato in quantità tale da produrre nell'uomo una fortissima reazione: malessere generale, elevazione di temperatura, forte irritazione locale, ingrossamento di glandole linfatiche ecc. ecc.

Tanto più cauti bisogna essere, in quanto è fatto noto a tutti quelli, che hanno avuto occasione di praticare vaccinazioni antipestose nell'uomo, che i diversi individui non reagiscono tutti nello stesso modo verso la stessa quantità di vaccino: ma vi sono degli individui che anche a dosi normali reagiscono molto fortemente, con notevole elevazione di temperatura e fatti locali e generali alquanto gravi.

È in base a questo dato di fatto, che non è possibile prendere come criterio nel dosaggio del vaccino antipestoso la dose minima mortale di esso per il ratto o la cavia. Verrebbero in tal modo ad usarsi dosi molto più elevate di quelle comunemente stabilite, le quali darebbero senza alcun dubbio delle reazioni molto gravi.

f) *Modo d' inoculazione.*

Se nella immunizzazione degli animali può essere importante la scelta della via da seguire nelle inoculazioni del vaccino, per l'uomo tale questione non esiste, non potendosi seguire altra via che la sottocutanea.

g) *Conservazione del vaccino.*

Mancano studi sperimentali intesi a dimostrare quanto tempo può il vaccino antipestoso conservarsi senza perdere la sua azione immunizzante.

Il *Lustig* afferma che il vaccino preparato col suo metodo e ridotto allo stato secco si conserva inalterato per lungo tempo se è tenuto in luogo oscuro, fresco, fuori il contatto dell'aria.

Il vaccino invece preparato uccidendo col calore le culture in brodo o su agar, benchè sia conservato in luogo oscuro e fresco, col tempo si va sempre più indebolendo.

Per le vaccinazioni antipestose dell'uomo si sogliono adoperare vaccini preparati di fresco : da non più di 3 - 4 mesi.

Sarebbe ad ogni modo di grande importanza pratica stabilire una serie di esperienze allo scopo di vedere per quanto tempo possa il vaccino antipestoso all'*Haffkine* conservare inalterato il suo potere immunizzante, e in quali condizioni esso si conservi meglio.

IV. Nostre esperienze.

a) *Animali da esperimento.*

Come animali da esperimento abbiamo adoperato quasi esclusivamente ratti e cavie. Abbiamo usato animali forti e sani, allevati nello stesso Laboratorio di Pianosa.

b) *Vaccini adoperati.*

I vaccini con cui abbiamo sperimentato sono i seguenti :

1) vaccino *Haffkine* ;
2) vaccino della Commissione tedesca ;
3) vaccino preparato nel Laboratorio di Pianosa ;
4) vaccino *Lustig - Galeotti.*

Questi vaccini sono stati preparati da noi stessi, attenendoci scrupolosamente alle prescrizioni date dagli autori.

Con ognuno di essi abbiamo stabilito una doppia serie di ricerche: vaccinazioni semplici e vaccinazioni ripetute con dosi crescenti.

Come via d'inoculazione ci siamo attenuti esclusivamente alle inoculazioni sottocutanee, essendo questo il metodo seguito per necessità nell'uomo: ed anche tenendo conto, che dalle esperienze della Commissione tedesca risulta, che colle inoculazioni endoperitoneali e sottocutanee si ottengono gli stessi effetti.

c) *Infezione degli animali.*

Un argomento, secondo noi, della più grande importanza in questo genere di ricerche è la qualità e la quantità di cultura di bacillo pestoso adoperato per infettare di peste gli animali da esperimento.

L'azione di un vaccino è sempre relativa a una data quantità di materiale infettante dotato di una data virulenza. Ed è legge generale che quest'azione si esplichi solamente in certi limiti: vedremo in seguito come, infettando gli animali con grosse dosi di bacillo pestoso, il vaccino, anche adoperato in grande quantità, restò senza efficacia alcuna.

Come materiale infettante nelle nostre ricerche abbiamo adoperato sempre la stessa cultura di peste, mantenuta virulenta mediante il passaggio attraverso il ratto.

In una serie di ricerche abbiamo stabilito di questa cultura la dose minima mortale, nel seguente modo.

Un'ansa di cultura di 2 giorni su agar fu finamente emulsionata in 10 cmc. di acqua sterilizzata: un centimetro cubico di detta emulsione fu diluito in 9 cmc. di acqua sterilizzata: e portando sempre un centimetro cubico dell'ultima diluzione in 9 cmc. di acqua sterile, si ebbero successivamente delle diluzioni contenenti in 1 cmc. $^1/_{10}$, $^1/_{100}$, $^1/_{1000}$, $^1/_{10000}$ ecc. di ansa di cultura. Si ebbe cura di usare sempre la medesima ansa di platino.

Da una serie di esperienze istituite su grande numero di animali, risultò che la cultura di peste da noi adoperata era capace di uccidere senza alcun fallo in 6-8 giorni la cavia e in 4-6 giorni il ratto, inoculata sottocute nella quantità di $^1/_{10000}$ di ansa. Quindi stabilimmo in questa cifra la dose minima mortale della cultura di peste da noi adoperata: ed allo scopo di ottenere una dose sicuramente mortale, infettammo i nostri animali col decuplo di questa dose minima mortale, vale a dire $^1/_{1000}$ di ansa di cultura di due giorni su agar. Questa dose uccise costantemente le cavie in 4-5 giorni e i ratti in 3-4 giorni.

Se si tien conto della quantità di cultura adoperata dai diversi autori per infettare gli animali da esperimento, si vedrà come in queste nostre ricerche abbiamo adoperato quantità notevolmente minore di materiale infettante. La Commissione tedesca infatti adoperò un'intera ansa di cultura virulenta: *Tavel* e i suoi collaboratori usarono anche un'ansa, od al minimo mezza. In generale fu questa la dose di materiale infettante adoperata da tutti.

In nessun lavoro noi abbiamo trovato accennato alla necessità, per provare l'azione di un vaccino antipestoso, di infettare gli animali con dosi non molto superiori alla dose minima mortale. Dai nostri esperimenti risulta che è questa una condizione indispensabile per ottenere dei risultati esatti. L'ansa di platino scelta come unità di misura da quasi tutti gli autori, in alcuni casi può rappresentare una quantità enorme di materiale infettante (culture virulenti), in altri una quantità sufficiente ed anche minima (culture attenuate).

In una serie di 9 cavie, vaccinate col vaccino della Commissione tedesca, usammo come dose di materiale infettante $^1/_{10}$ di ansa della nostra cultura. I risultati furono addirittura negativi. Gli animali vaccinati morirono tutti di setticemia pestosa contemporaneamente ai controlli (vedi tabella N. 1).

TABELLA N. 1.

Vaccino della Commissione Tedesca.

Numero d'ordine		Vaccinazione 29 - 8 - 03	Infezione 14 - 9 - 03	Esito	
1	Cavia	c. c. 3	$\frac{1}{10}$ di ansa	Muore	18 - 9 - 03
2	»	»	»	»	»
3	»	»	»	»	»
4	»	»	»	»	»
5	»	»	»	»	»
6	»	»	»	»	»
7	»	»	»	»	»
8	»	»	»	»	»
9	»	»	»	»	20 - 9 - 03
10	»	»	»	»	
	(Controlli)				
11	»		»	»	18 - 9 - 03
12	»		»	»	»

È bene qui osservare, che mentre questo stesso vaccino manifestò notevole azione immunizzante negli animali infettati con un $^1/_{1000}$ di ansa, restò del tutto inattivo se gli animali furono infettati con un $^1/_{10}$ di ansa.

E tanto più in questo genere di esperienze ci sembra giustificato l'uso di dosi infettanti piccole, di poco superiori alla dose minima mortale, in quanto che l'uomo con ogni probabilità non s'infetta naturalmente di peste con grande quantità di materiale.

Come mezzo d'infezione in queste nostre esperienze ci siamo serviti quasi escluvisamente delle inoculazioni sottocutanee, per ottenere una certa uniformità di giudizio.

In tutti gli animali morti fu praticato l'esame batteriologico e la diagnosi di setticemia pestosa fu sempre basata sulle ricerche microscopiche e culturali.

È ozioso che noi facciamo qui notare i pericoli inerenti a queste ricerche istituite su largo materiale. Pur troppo non sono rari i casi che la storia registra d'infezioni pestose prese in Laboratorio. Noi ad ogni modo siamo convinti, che, usando la massima vigilanza e le più scrupulose e severe cautele nella custodia degli animali infetti, nella distruzione dei cadaveri, nella disinfezione di tutti gli oggetti adoperati e in tutte le operazioni da eseguire, questi pericoli possono essere completamente eliminati.

Risultati delle nostre esperienze.

Nelle annesse tabelle riportiamo tutte le esperienze da noi istituite sulle vaccinazioni: vaccinazioni semplici e vaccinazioni ripetute.

Tabella N. 2.

Vaccino della Commissione Tedesca.

Numero d'ordine	Vaccinazione 11 marzo 04.	Infezione 21 marzo 04.	Esito
1 Ratto	c. c. 2	$\frac{1}{1000}$ di ansa	Muore 27 - 3 - 04
2 »	»	»	» »
3 »	»	»	» 5 - 3 - 04
4 »	»	»	Vive
5 »	»	»	»
6 »	»	»	»
7 »		»	Muore 25 - 3 - 04
(Controllo)			
8 »		»	» »
9 »		»	» »

TABELLA N. 3.

Vaccino della Commissione Tedesca.

Numero d'ordine	Vaccinazione 29 marzo 04	Infezione 7 marzo 04	Esito
1 Cavia	c. c. 2	$\frac{1}{1000}$ di ansa	Muore 15 - 4 - 04
2 »	»	»	» 17 - 4 - 04
8 »	»	»	» 18 - 4 - 04
4 »	c. c. 4	»	» 20 - 4 - 04
5 »	»	»	» 23 - 4 - 04
6 »	»	»	Vive
7 »		»	Muore 11 - 4 - 04
(Controllo)			
8 »		»	» »
9 »		»	» »

Tabella N. 4.

Vaccino Haffkine.

Numero d'ordine		Vaccinazione 11 marzo 04	Infezione 21 marzo 04	Esito	
1	Ratto	c. c. 3	$\frac{1}{1000}$ di ansa	Muore	25 - 3 - 04
2	»	»	»	»	»
3	»	»	»	»	28 - 3 - 04
4	»	»	«	»	»
5	»	»	»	»	30 - 3 - 04
6	»	»	»	Vive	
7	»	»	»	»	
8	»	»	»	»	
9	»		»	Muore	24 - 3 - 04
(Controllo)			»	»	»
10	»		»	»	»
11	»		»	»	»

TABELLA N. 5.

Vaccino Haffkine.

Numero d'ordine	Vaccinazione 29 marzo 04	Infezione 7 marzo 04	Esito
1 Cavia	c. c. 3	$\frac{1}{1000}$ di ansa	Muore 14 - 4 - 04
2 »	»	»	» »
3 »	»	»	» 15 - 4 - 04
4 »	c. c. 6	»	» 16 - 4 - 04
5 »	»	»	» 17 - 4 - 04
6 »	»	»	Vive
7 »		»	Muore 11 - 4 - 04
(Controllo)			
8 »		»	» »
9 »		»	» »

TABELLA N. 6.

Vaccino Pianosa.

Numero d'ordine	Vaccinazione 11 Marzo 04	Infezione 21 marzo 04	Esito
1 Ratto	c. c. 3	$\frac{1}{1000}$ di ansa	Muore 31 - 3 - 04
2 »	»	»	» »
3 »	»	»	» 2 - 4 - 04
4 »	»	»	» »
5 »	»	»	» 4 - 3 - 04
6 »	»	»	Vive
7 »	»	»	»
8 »	»	»	»
9 » (Controllo)		»	Muore 25 - 3 - 04
10 »		»	» »
11 »		»	» »

TABELLA N. 7.

Vaccino Pianosa.

Numero d'ordine		Vaccinazione 29 marzo 04	Infezione 7 marzo 04	Esito
1	Cavia	c. c. 3	$\frac{1}{1000}$ di ansa	Muore 14 - 4 - 04
2	»	»	»	» »
3	»	»	»	» 20 - 4 - 04
4	»	c. c. 6	»	» 25 - 4 - 04
5	»	»	»	» 29 - 4 - 04
6	»	»	»	Vive
7	»		»	Muore 11 - 4 - 04
(Controllo)				
8	»		»	» »
9	»		»	» »

TABELLA N. 8.

Vaccino Lustig.

Numero d'ordine		Vaccinazione 11 marzo 04	Infezione 21 marzo 04	Esito	
1	Ratto	mmgr. 22	$\frac{1}{1000}$ di ansa	Muore	25 - 3 - 04
2	»	»	»	»	27 - 3 - 04
3	»	»	»	»	30 - 3 - 04
4	»	»	»	»	26 - 3 - 04
5	»	»	»	Vive	
6	»	»	»	»	
7	»		»	Muore	25 - 3 - 04
	(Controllo)				
8	»		»	»	»
9	»		»	»	»

TABELLA N. 9.

Vaccino Lustig.

Numero d'ordine	Vaccinazione 11 marzo 04	Infezione 22 marzo 04	Esito
1 Cavia	mmgr. 22	$\frac{1}{1000}$ di ansa	Muore 30 - 3 - 04
2 »	»	»	» »
3 »	»	»	» 31 - 3 - 04
4 »	»	»	» 2 - 4 - 04
5 »	»	»	» 15 - 4 - 04
6 »	»	»	» 26 - 3 - 04
(Controllo)			
7 »		»	» »
8 »		»	» »

TABELLA N. 10.

Vaccino della Commissione Tedesca.

N. d'ordine	Prima vaccinazione 10 marzo 04	Seconda vaccinazione 25 marzo 04	Infezione 4 aprile 04	Esito
1 Cavia	c. c. 2	c. c. 4	$\frac{1}{1000}$ di ansa	Muore 14 - 4 - 04
2 »	»	»	»	» 16 - 4 - 04
3 »	»	»	»	Vive
4 »	c. c. 4	c. c. 8	»	Muore 13 - 4 - 04
5 »	»	»	»	Vive
6 »	»	»	»	»
7 »	»	»	»	»
8 »	»	»	»	»
9 »	»	»	»	Muore 8 - 4 - 04
(Controllo)				
10 »			»	» »
11 »			»	» »

Tabella N 11.

Vaccino Haffkine.

N. d'ordine	Prima vaccinazione 10 marzo 04	Seconda vaccinazione 25 marzo 04	Infezione 4 aprile 04	Esito
1 Cavia	c. c. 3	c. c. 6	$\frac{1}{1000}$ di ansa	Muore 13 - 4 - 04
2 »	»	»	»	» 13 - 4 - 04
3 »	»	»	»	» 13 - 4 - 04
4 »	»	»	»	» 15 - 4 - 04
5 »	»	»	»	Vive
6 »	c. c. 6	c. c. 12	»	Muore 15 - 4 - 04
7 »	»	»	»	» 15 - 4 - 04
8 »	»	»	»	Vive
9 »	»	»	»	»
10 »	»	»	»	»
11 » (Controllo)			3	Muore 8 - 4 - 04
12 »			»	» »
13 »			»	» »

Tabella N. 12.

Vaccino Pianosa.

N. d'ordine	Prima vaccinazione 10 marzo 04	Seconda vaccinazione 25 marzo 04	Infezione 4 aprile 04	Esito	
1 Cavia	c. c. 3	c. c. 6	$\frac{1}{1000}$ di ansa	Muore	12 - 4 - 04
2 »	»	»	»	»	12 - 4 - 04
3 »	»	»	»	»	13 - 4 - 04
4 »	»	»	»	Vive	
5 »	»	»	»	»	
6 »	c. c. 6	c. c. 12	»	Muore	16 - 4 - 04
7 »	»	»	»	»	16 - 4 - 04
8 »	»	»	»	Vive	
9 »	»	»	»	»	
10 »	»	»	»	»	
11 » (controllo)			»	Muore	8 - 4 - 04
12 »			»	»	»
13 »			»	»	»

TABELLA N. 13.

Vaccino Lustig.

N. d'ordine	Prima vaccinazione 10 marzo 04	Seconda vaccinazione 25 marzo 04	Infezione 4 aprile 04	Esito
1 Cavia	mmgr. 22	mmgr. 32	$\frac{1}{1000}$ di ansa	Vive
2 »	»	»	»	»
3 »	»	»	»	»
4 »	»	»	»	»
5 »	»	»	»	Muore 13 - 4 - 04
6 »	»	»	»	» 16 - 4 - 04
7 »	»	»	»	» 19 - 4 - 04
8 »			»	» 8 - 4 - 04
(Controllo)				
9 »			»	» »
10 »			»	» »

Qui daremo solamente un sommario dei risultati ottenuti con queste ricerche.

a) *Vaccinazioni semplici.*

I. Vaccino della Commissione tedesca.

a) *Ratti* - Col vaccino della Commissione tedesca furono vaccinati 6 ratti. La dose di vaccino inoculata fu quella corrispondente ad una cultura su agar di 2-3 giorni emulsionata in 2 cmc. di brodo e riscaldata per 1 ora a 65°, senza aggiunta di acido fenico, che sui ratti ha azione nociva.

Dopo 10 giorni questi 6 ratti furono infettati contemporaneamente a 3 controlli con $^1/_{1000}$ di ansa di bacillo virulentissimo di peste. Mentre i 3 ratti di controllo morirono di setticemia pestosa al 4° giorno, dei 6 ratti vaccinati 3 sopravissero: 2 morirono 2 giorni dopo i controlli e 1 morì 11 giorni dopo i controlli.

Se il vaccino quindi non riuscì a proteggere tutti i ratti dall'infezione pestosa, su tutti esercitò una notevole azione immunizzante, ritardandone la morte.

b) *Cavie* - Furono vaccinate 6 cavie: 3 con una dose normale (una cultura su agar) e 3 con una dose doppia di vaccino (2 culture su agar). L'infezione avvenne dopo 10 giorni con $^1/_{1000}$ di ansa inoculata sotto cute. Di queste cavie se ne salvò una sola, tra quelle vaccinate con dose doppia di vaccino: le altre morirono d'infezione pestosa. Ma mentre i 3 controlli soggiacquero all'infezione al 4° giorno, le cavie vaccinate morirono da 4 fino a 12 giorni dopo di essi: e propriamente le cavie vaccinate con dose doppia di vaccino sopravissero per più lungo tempo.

II. Vaccino Haffkine.

a) *Ratti* - Si vaccinarono 8 ratti, inoculando ad essi sotto cute 3 cmc. di vaccino preparato secondo il metodo classico di *Haffkine*. Dopo 10 giorni questi ratti furono infettati con $^1/_{1000}$ di ansa di cultura di peste e contemporaneamente ad essi furono infettati 3 ratti di controllo. Mentre questi animali di

controllo morirono tutti di setticemia pestosa nel corso del 4° giorno, degli 8 ratti vaccinati, 3 sopravissero e gli altri 5 morirono fino a 6 giorni dopo i controlli.

b) *Cavie* - Collo stesso vaccino furono trattate 6 cavie: 3 con una dose normale (3 cmc.) e 3 con una dose doppia (6 cmc.). Dopo 10 giorni esse furono infettate con $^1/_{1000}$ di ansa di cultura di peste e contemporaneamente si infettarono anche 3 cavie di controllo, le quali morirono tutte d'infezione pestosa nel corso della 4ª giornata. Delle 6 cavie vaccinate se ne salvò una: le altre 5 morirono di peste: e propriamente: delle 3 cavie inoculate con 6 cmc. di vaccino 1 si salvò e 2 morirono 5-6 giorni dopo i controlli: delle 3 cavie inoculate con 3 cmc. di vaccino morirono tutte 3-4 giorni dopo i controlli.

III. Vaccino del Laboratorio di Pianosa.

a) *Ratti* - A 8 ratti s'inocularono sotto cute 3. cmc. di vacino antipestoso preparato nel Laboratorio di Pianosa. Dopo 10 giorni questi ratti e 3 di controllo furono infettati con $^1/_{1000}$ di ansa di cultura di peste per la via sottocutanea. Mentre i controlli contrassero tutti l'infezione e morirono in 4ª giornata, dei ratti vaccinati 4 sopravvissero e gli altri morirono da 6 fino a 10 giorni dopo i controlli.

b) *Cavie* - Collo stesso vaccino furono inoculate 6 cavie: 3 con 3 cmc. e 3 con 6 cmc. di vaccino. Dopo 10 giorni queste cavie e 3 di controllo furono infettate sotto cute con $^1/_{1000}$ di ansa di cultura di peste. I controlli morirono tutti dopo 4 giorni: delle 3 cavie vaccinate con 6 cmc. di vaccino 1 sopavvisse e 2 morirono 14-18 giorni dopo i controlli: delle 3 vaccinate con 3 cmc. di vaccino morirono tutte, sopravvivendo ai controlli di 3-9 giorni.

IV. Vaccino Lustig.

a) *Ratti* - A 6 ratti s'inocularono sotto cute 22 milligrammi di vaccino *Lustig-Galeotti* sciolto in acqua alcalina. Dopo 14 giorni questi ratti e 3 di controllo furono infettati sotto cute con $^1/_{1000}$ di ansa di platino di cultura di peste. I tre controlli mori-

rono di peste dopo 4 giorni: dei 6 ratti vaccinati 2 sopravvissero, e gli altri 4 morirono: 1 contemporanemente ai controlli, gli altri 1, 2, 5 giorni dopo di essi.

b) *Cavie* - Colla stessa quantità di vaccino *Lustig-Galeotti* furono inoculate sotto cute 6 cavie, le quali furono infettate dopo 14 giorni contemporaneamente a tre controlli con $^1/_{1000}$ di ansa di cultura di peste. Nessuna delle cavie vaccinate sopravvisse: in esse fu solamente ritardata la morte in confronto dei controlli.

b) *Vaccinazioni ripetute.*

Questa serie di esperienze è limitata solamente alle cavie, che, come abbiamo visto, nelle vaccinazioni semplici non ci dettero risultati così buoni, come i ratti.

I. Vaccino della commissione tedesca.

Furono vaccinate 8 cavie col vaccino della Commissione tedesca: 3 con una dose normale (1 cultura su agar). 5 con una dose doppia (2 culture su agar). Dopo 15 giorni queste cavie furono rivaccinate con una quantità rispettivamente doppia dello stesso vaccino: le prime 3 con due culture e le altre 5 con 4 culture su agar.

Si lasciarono passare 10 giorni dopo questa seconda vaccinazione e s'infettarono queste cavie e tre cavie di controllo, con $^1/_{1000}$ di ansa di platino di cultura di peste. Mentre i controlli morirono tutti d'infezione pestosa; delle cavie rivaccinate ne sopravvissero 5 e 3 morirono 5-8 giorni dopo i controlli. Delle 5 cavie sopravvissute 4 appartengono alle 5 cavie inoculate con 2 e 4 culture di peste su agar emulsionate in brodo e tenute per 1 ora a 65°.

II. Vaccino Haffkine.

Con questo vaccino furono trattate 10 cavie, di cui 5 furono inoculate con 3 cmc. e 5 con 6 centimetri cubici di vaccino. Dopo 15 giorni queste 10 cavie furono rivaccinate con quantità doppie di vaccino; quindi alle prime 5 s'inocularono 6 cmc. e alle altre 5 s'inocularono 12 cmc. di vaccino.

Dopo 10 giorni queste cavie rivaccinate e tre di controllo furono infettate con $^1/_{1000}$ di ansa di cultura sotto cute. Mentre i controlli morirono tutti per setticemia pestosa: delle 10 cavie rivaccinate se ne salvarono 4: di cui una tra le 5 inoculate con 3 e 6 cmc. e 3 tra quelle inoculate con 6 e 12 cmc. di vaccino. Nelle altre fu solo ritardata la morte in confronto dei controlli.

III. Vaccino di Pianosa.

Con questo vaccino furono inoculate sotto cute 10 cavie: e di queste 5 con 3 cmc. e 5 con 6 cmc. di vaccino. Dopo 15 giorni queste cavie furono rivaccinate, inoculando alle prime 5, 6 cmc. e alle altre 5, 12 cmc. di vaccino.

L'infezione avvenne dopo 10 giorni dalla seconda vaccinazione, mediante l'inoculazione sottocutanea di $^1/_{1000}$ di ansa di cultura di peste. Contemporaneamente furono infettati 3 cavie di controllo, che morirono tutte di setticemia pestosa. Delle 10 cavie rivaccinate se ne salvarono invece 5 e le altre morirono da 4 fino a 10 giorni dopo i controlli.

IV. Vaccino Lustig.

A 7 cavie furono inoculate sotto cute 22 milligrammi di vaccino *Lustig-Galeotti* e dopo 15 giorni ancora 32 milligrammi di sostanza secca sciolta in acqua alcalina. Dopo 10 giorni queste sette cavie e tre di controllo furono infettate con $^1/_{1000}$ di ansa di platino di cultura di peste. Delle sette cavie rivaccinate se ne salvarono 4, mentre le altre 3 morirono 5, 8, 11 giorni dopo i controlli, che morirono tutti in 4ª giornata.

Osservazioni.

Se si paragonano i risultati da noi ottenuti sull'efficacia dei diversi vaccini con quelli di altri autori, si constaterà facilmente come i nostri siano molto più favorevoli.

Il *Tavel, Krumbein* e *Glücksmann* non riuscirono in alcun caso a produrre coi diversi vaccini adoperati, nemmeno

ricorrendo alle vaccinazioni ripetute più volte, una completa immunizzazione nelle cavie. A noi invece è riuscito non solo colle vaccinazioni ripetute con dosi crescenti, ma anche con una sola vaccinazione di conferire alle cavie un'immunità completa verso l'infezione prodotta da una dose di bacillo pestoso sicuramente mortale.

Anche noi del resto abbiamo potuto dimostrare, come la cavia si comporti in generale verso le vaccinazioni antipestose in modo diverso dei ratti, nel senso che ad esse è più difficile conferire una completa immunità verso l'infezione pestosa.

Infatti su 24 cavie vaccinate una sola volta solo 3 sopravvissero: mentre su 28 ratti vaccinati una sola volta ne sopravvissero 11.

Risultati molto confortanti ci hanno dato le rivaccinazioni con dosi crescenti. Di 35 cavie rivaccinate sopravvissero ben 18 all'infezione prodotta da una dose di bacillo pestoso capace di uccidere i controlli in 4-5 giorni.

Per mancanza di ratti non potemmo estendere anche su questi animali le esperienze colle rivaccinazioni: ma, tenendo conto dei risultati ottenuti colle cavie, siamo sicuri che essi sarebbero stati ancora più favorevoli.

Da queste nostre esperienze risulta chiaramente dimostrato che il vaccino antipestoso preparato secondo *Haffkine*, secondo la Commissione tedesca, secondo Pianosa e il vaccino antipestoso *Lustig-Galeotti* sono capaci di conferire ai ratti e alle cavie una completa immunità verso l'infezione pestosa. Tale proprietà immunizzante di questi diversi vaccini è messa in evidenza molto meglio nei ratti, che nelle cavie, le quali però difficilmente in seguito a una sola vaccinazione acquistano una immunità completa.

Ad ogni modo l'azione dei vaccini antipestosi fu potuta constatare in tutti i casi, perchè gli animali, che non furon salvati, mostrarono costantemente una maggiore resistenza verso l'infezione, sopravvivendo sempre parecchi giorni ai controlli e soccombendo spesso a quella forma d'infezione che il *Tavel* ed i suoi collaboratori chiamarono, forma cronica dell'infezione pestosa.

Per spiegarci la diversità dei risultati da noi ottenuti, specialmente per ciò che riguarda le esperienze sulle cavie, noi diamo molta importanza alla quantità di cultura adoperata per infettare gli animali.

Abbiamo già fatto osservare come tutti i ricercatori abbiano infettato gli animali vaccinati con una dose di bacillo pestoso virulento molto superiore a quella adoperata da noi. Nè essi si sono preoccupati di stabilire questa dose partendo, come abbiamo fatto noi dalla dose minima mortale : ma in generale, attenendosi alle prescrizioni della Commissione, hanno preso come dose infettante un'ansa di platino di una cultura di bacillo virulento di 24 ore su agar.

Noi insistiamo ancora quì una volta sul concetto generale, che la immunità conferita ad un animale è sempre relativa alla dose infettante: e se questa è di molto superiore alla dose minima mortale non si riesce a produrre alcuna immunità anche inoculando forti quantità di vaccino.

A sostegno di quanto diciamo, abbiamo già ricordato, come avendo noi infettato 10 cavie vaccinate con $^1/_{10}$ di ansa della nostra cultura, la cui dose minima mortale era di $^1/_{10000}$ di ansa, nessuna di queste si salvò. Morirono tutte o contemporaneamente o 1-2 giorni dopo i controlli.

In base a questi dati dell'esperimento, siamo convinti, che risultati migliori avremmo ottenuto in queste nostre esperienze, se avessimo usato, per infettare gli animali, la dose minima mortale o un multiplo minore di quello da noi adoperato.

Usando il decuplo della dose minima mortale, abbiamo già scelto una quantità abbastanza elevata. Ma abbiamo creduto prudente di ricorrere a tale dose per essere sempre e in tutti i casi sicuri di usare una quantità sicuramente mortale, che ci garentisse da tutti gli errori meccanici di dosaggio. Il fatto, che i numerosi controlli da noi infettati sono morti infallantemente di setticemia pestosa, ci ha dimostrato che il nostro scopo fu raggiunto.

Da queste ricerche risulta anche chiaramente dimostrato che l'efficacia del vaccino antipestoso è in diretto rapporto colla

quantità di esso inoculata. Colle forti quantità di vaccino noi avemmo sempre migliori risultati.

Di 18 cavie vaccinate una sola volta coi vaccini *Haffkine*, della Commissione tedesca e di Pianosa, 9 ricevettero sotto cute una dose di vaccino: 9 una quantità doppia. Le prime 9 morirono tutte: delle altre 9 se ne salvarono 3 e le altre 6 sopravvissero ai controlli sempre più lungamente di quelle inoculate con minore quantità di vaccino. Lo stesso fatto fu constatato nelle cavie rivaccinate: di esse si salvarono più comunemente quelle in cui si adoperò una quantità doppia di vaccino tanto nella prima, come nella seconda vaccinazione.

Va da sè, che la quantità di vaccino inoculata una sola volta non deve sorpassare certi limiti: ma dalla serie delle nostre esperienze noi abbiamo tratto il convincimento, che per ottenere i migliori risultati nelle vaccinazioni antipestose, si dovrebbe inoculare di un vaccino la quantità massima tollerata. Ora se nelle esperienze sugli animali questa quantità può anche di poco essere inferiore alla dose mortale di vaccino: per le vaccinazioni nell'uomo essa deve ancora essere mantenuta in limiti molto più bassi, per evitare forti reazioni e gravi disturbi. Ad ogni modo noi crediamo che le dosi prescritte per i diversi vaccini sieno da considerarsi come le dosi minime da usarsi. Nè noi abbiamo potuto confermare, ciò che affermano alcuni autori [1], che inoculando in un animale forti dosi di vaccino antipestoso, l'animale acquisti una maggiore suscettività per la peste.

Se il vaccino è inoculato in una quantità superiore a quella che l'animale può tollerare, esso muore: ma se l'animale, anche dopo parecchi giorni di reazione gravissima, guarisce completamente e ritorna al normale, esso mostra una forte immunità, verso l'infezione pestosa.

Nelle nostre esperienze abbiamo potuto constatare, che, ripetendo la vaccinazione dopo 10-15 giorni con dosi doppie di vaccino, si ottengono ottimi risultati. Mentre infatti su 24 cavie vaccinate una sola volta se ne salvarono appena 3 (12 %): su 35 cavie vaccinate due volte se ne salvarono invece 18 (50, 30 %).

(1) *Wyssokowitz et et Zobolotny.* l. c,

Tra le condizioni ritenute indispensabili per l'uso pratico delle vaccinazioni antipestose nell'uomo vi è quella, che una sola inoculazione debba essere sufficiente per conferire una completa immunità.

E certo, se si pensa che per avere la manifestazione dell'immunità colle vaccinazioni bisogna per lo meno aspettare 6-7 giorni e che per ottenere gli effetti della seconda vaccinazione bisogna aspettare ancora altri 6-7 giorni, si comprenderà facilmente come il metodo delle rivaccinazioni, i cui buoni effetti si manifestano solo dopo 15-20 giorni, non può essere adottato come regola generale nella profilassi di una malattia, in cui il più delle volte s'impone un'azione pronta ed immediata.

Ma non per questo le vaccinazioni ripetute con dosi crescenti devono essere senz'altro eliminate dalla pratica. Dal momento che con esse si conferisce un'immunità più completa, noi consigliamo di adoperarle in tutte quelle persone (medici, assistenti, infermieri, operai adibiti in luoghi infetti ecc.), che in una lunga e grave epidemia di peste sono costretti per molto tempo ad esporsi ai pericoli di un'infezione pestosa.

Una delle questioni più importanti sollevata da diversi autori è stata la seguente: sono i risultati ottenuti nelle esperienze sugli animali applicabili all'uomo?

Abbiamo già detto, come le vaccinazioni antipestose sieno state applicate nell'uomo e come in numerose statistiche sieno stati riportati gli ottimi risultati ottenuti con esse. Ma nello stesso tempo abbiamo anche accennato alle critiche mosse a queste statistiche e alle difficoltà grandissime che s'incontrano per provare l' efficacia delle vaccinazioni nell' uomo. In base a queste considerazioni, abbiamo sostenuto la necessità di esperimentare sugli animali l'efficacia dei vaccini antipestosi.

Ora dai risultati di queste ricerche noi possiamo solo ricavare un criterio d'indôle generale, che si riassume così: i vaccini antipestosi sono capaci di conferire agli animali (ratti e cavie) una completa immunità verso l'infezione pestosa.

Possiamo noi senz'altro applicare questi risultati all'uomo?

Noi crediamo di sì. L'uomo non può sottrarsi all'azione dei vaccini antipestosi: questo noi possiamo e dobbiamo ritenere in linea generale.

Ciò che non possiamo applicare senz'altro all'uomo sono le particolarità inerenti alle vaccinazioni. Esse possono essere applicate all'uomo solo per analogia, come per es. la quantità di vaccino necessaria nell'uomo per produrre una completa immunità: la comparsa e la durata dell'immunità ecc. ecc.

Ma anche nello stabilire sull'uomo queste particolarità, i dati dell'esperimento possono solo dare un giusto criterio.

È fatto assodato che le varie specie di animali si comportano molto diversamente verso l'azione immunizzante che su di essi esercita il vaccino antipestoso. E noi stessi, senza citare i risultati degli altri autori, abbiamo potuto constatare una notevole differenza tra le cavie e i ratti riguardo all'azione del vaccino antipestoso su di essi.

La Commissione tedesca intanto ha potuto dimostrare, che meno un animale è suscettivo verso l'infezione pestosa e più facilmente si può ad essi conferire una completa immunità colle vaccinazioni. Ora senza alcun dubbio l'uomo non è più suscettivo verso la peste dei ratti e delle cavie. Se si tien conto anzi del decorso che più comunemente la peste assume in esso (forma bubbonica), e del fatto che può naturalmente guarire da un' infezione anche grave di peste, si deve ritenere che l'uomo oppone ad essa naturalmente una notevole resistenza. Da questo punto di vista quindi egli si troverebbe nelle migliori condizioni per essere completamente immunizzato con le vaccinazioni verso l'infezione pestosa.

Ma a suo vantaggio concorre anche un'altra circostanza. Un altro fatto è chiaramente dimostrato dall'esperimento ed è, che l'azione di un vaccino antipestoso, è in relazione colla virulenza e colla quantità del materiale infettante. Maggiore è la virulenza e la quantità di bacillo pestoso con cui l'animale viene infettato, più problematica è l'azione delle vaccinazioni antipestose.

Ora se si pensa che con ogni probabilità nell'infezione naturale

dell'uomo il materiale infettante è comunemente rappresentato da quantità minime, certo non molto superiori alla dose minima mortale, anche sotto questo punto di vista l'uomo si presta molto bene a subire la completa azione delle vaccinazioni antipestose.

È in base a quesi dati sperimentali, che le statistiche sui risultati delle vaccinazioni nell'uomo, quantunque non cessino per questo di essere immuni da critiche, acquistano intero il loro valore.

Senza fermarci più lungamente su di esse, quì vogliamo solo ricordare due casi osservati durante l'epidemia pestosa a Napoli del 1901, e menzionati nella Relazione del Direttore generale della sanità pubblica al Consiglio superiore di Sanità (1) (pag. 24).

1) Fra gl'isolati a Nisida si svilupparono 3 casi di peste; tutti e tre colpirono individui che non erano stati vaccinati.

2) Nelle pratiche di risanamento del mulino Tartarone una delle condizioni imposte con decreto prefettizio fu di escludere ogni persona che non fosse vaccinata. Per un deplorevole equivoco fu assunto ai lavori un operaio il quale non aveva subìto la vaccinazione antipestosa. Quest'uno contrasse la peste e ne morì.

Senza voler dare a questi casi, come è detto nella stessa relazione un valore assoluto, essi, uniti a tutte le altre osservazioni fatte sull'uomo e sugli animali, contribuiscono senza alcun dubbio a dimostrare l'efficacia delle vaccinazioni antipestose. E nell'uomo l'efficacia di tali vaccinazioni può esplicarsi in due modi: o impedendo lo sviluppo della malattia o rendendone il decorso più benigno con esito a guarigione.

Limiti delle vaccinazioni antipestose.

Una questione molto importante sulla pratica delle vaccinazioni antipestose fu sollevata dal *Calmette* nel Congresso d'Igiene e Demografia a Parigi nel 1900.

Il *Calmette* affermò che, inoculato il vaccino antipestoso nel

(1) R. *Santoliquido.* - Relazione al Consiglio superiore di Sanità sui casi di peste bubbonica a Napoli.

periodo d'incubazione, la malattia veniva ad essere considerevolmente aggravata.

Il *Calmette* ed il *Salimbeni* in alcune esperienze istituite nel laboratorio di Bombay, avevano potuto constatare il fatto che i topi inoculati contemporaneamente con culture di peste riscaldate a 70° e con una dose di virus pestoso attenuata, incapace di dare la morte ai topi, morirono di setticemia pestosa: mentre gli animali che ricevettero solamente il virus pestoso sopravvissero.

Fin dal 1898 la Commissione tedesca aveva dimostrato in una serie di esperienze, che l'immunità nelle vaccinazioni antipestose non si manifestava prima di 5 giorni e gli animali vaccinati ed infettati di peste nei primi cinque giorni morivano come i controlli. L'*Haffkine* invece sostenne l'opinione che l'immunità si manifestasse già 24 ore dopo le vaccinazioni, quantunque egli stesso nelle sue statistiche noti il fatto che nelle persone vaccinate molte volte nei primi giorni dopo la vaccinazione si sviluppò l'infezione pestosa.

Il *Bannermann*, come abbiamo detto, oppugnò le idee del *Calmette* e *Salimbeni*, servendosi dei dati delle statistiche nell'uomo. Siccome nelle Indie le vaccinazioni antipestose furono specialmente praticate sugli individui sospetti di aver contratta l'infezione pestosa, se fosse vero, dice il *Bannermann*, che le vaccinazioni praticate nel periodo d'incubazione della malattia aggravano l'infezione, la mortalità nei vaccinati dovrebbe essere molto maggiore che nei non vaccinati. Da una statistica invece riportata dal *Bannermann*, risulta, che la mortalità nei vaccinati sarebbe del 43 $^0/_0$ contro una mortalità del 73 $^0/_0$ nei non vaccinati.

Data questa discrepanza di opinioni, abbiamo creduto opportuno di sottomettere tale questione ad una serie di esperienze sui ratti e sulle cavie.

I risulati di queste ricerche sono stati raccolti nelle annesse tabelle.

TABELLA N. 14.

Numero d'ordine		Vaccinazione	Infezione	Esito
1	Ratto	27 - 7 - 04	27 - 7 - 04	Muore 30 - 8 - 04
2	»	c. c. 2	$\frac{1}{1000}$ di ansa	» »
3	»	»	»	» »
4	»	»	»	» 1. 8. 04.
5	»	»	»	» »
6	»	»	»	» 29. 7. 04.
7	Controllo	»	»	» 30. 7. 04.
8	»		»	» »
9	»		»	» »
10	Ratto	27 - 7 - 04	28 - 7 - 04	Muore 1 - 8 - 04
11	»	c. c. 2	$\frac{1}{1000}$ di ansa	» »
12	»	»	»	» 2. 8. 04.
13	»	»	»	» »
14	»	»	»	» »
15	»	»	»	» 3. 8. 04.
16	Controllo	»	»	» 2. 8. 04.
17	»		»	» »
18	»		»	» »
19	Ratto	27 - 7 - 04	29 - 7 - 04	Muore 3 - 8 - 01
20	»	c. c. 2	$\frac{1}{1000}$ di ansa	» »
21	»	»	»	» »
22	»	»	»	» 4. 8. 04.
23	»	»	»	» »
24	»	»	»	» »
25	Controllo	»	»	» 3. 8. 04.
26	»		»	» »
27	»		»	» »
28	Ratto	27 - 7 - 04.	30 - 7 - 04	Muore 4 - 8 - 04
29	»	c. c. 2	$\frac{1}{1000}$ di ansa	» »
30	»	»	»	» »
31	»	»	»	» 5. 8. 04.
32	»	»	»	» »
33	»	»	»	» »
34	Controllo	»	»	» 4. 8 04.
35	»		»	» »
36	»		»	» »

TABELLA N. 15.

Numero d'ordine	Vaccinazione	Infezione	Esito
1 Cavia	27 - 7 - 04	27 - 7 - 04	Muore 1 - 8 - 04
2 »	c. c. 2	$\frac{1}{1000}$ di ansa	» 29 - 7 - 04
3 »	»	»	» 30 - 7 - 04
4 »	»	»	» 30 - 7 - 04
(Controllo)			
5 »		»	» »
6 Cavia	27 - 7 - 4	28 - 7 - 04	Muore 1 - 8 - 04
7 »	c. c. 2	$\frac{1}{1000}$ di ansa	» 2 - 8 - 04
8 »	»	»	» 3 - 8 - 04
9 »	»	»	» 2 - 8 - 04
(Controllo)			
10 Cavia	27 - 7 - 04	29 - 7 - 04	Muore 3 - 8 - 03
11 »	c. c. 2	$\frac{1}{1000}$ di ansa	» 3 - 8 - 04
12 »	»	»	» 3 - 8 - 04
13 »	»	»	» 3 - 8 - 04
(Controllo)			
14 Cavia	27 - 7 - 04	30 - 7 - 04	Muore 4 - 8 - 04
15 »	c. c. 2	$\frac{1}{1000}$ di ansa	» 4 - 8 - 04
16 »	»	»	» 4 - 8 - 04
17 »	»	»	» 4 - 8 - 04
(Controllo)			

I. *Ratti* - A 6 ratti si pratica contemporaneamente la vaccinazione antipestosa e l'inoculazione di $^1/_{1000}$ d' ansa di cultura di peste, nello stesso tempo s'infettano colla medesima quantità di bacillo pestoso 3 ratti di controllo. Tutti gli animali muoiono di setticemia pestosa, quasi alla stessa epoca.

b) Si trattano con vaccino antipestoso 6 ratti e dopo 24 ore sono infettati con $^1/_{1000}$ di ansa di cultura: contemporaneamente s'infettano anche 3 controlli. Tutti gli animali soccombono senza notevoli differenze all'infezione pestosa.

c) Altri 6 ratti vengono infettati 48 ore dopo la subita vaccinazione. Questi ratti muoiono contemporaneamente ad altri 3 infettati per controllo.

d) Altri 6 ratti sono infettati 72 ore dopo essere stati vaccinati. Anche questi soccombono alla setticimia pestosa contemporaneamente ai 3 controlli.

2 *Cavie.* - Questa stessa serie di ricerche fu ripetuta sulle cavie; si vaccinarono con vaccini della Commissione tedesca 12 cavie, e di queste 3 furono infettate con $^1/_{1000}$ di ansa di culture di peste contemporaneamente : 3, 24 ore dopo : 3, 48 ore, e 3, 72 ore dopo la vaccinazione.

Tutte queste cavie morirono di setticemia pestosa nello stesso modo dei controlli.

Da questi esperimenti risulta quindi, che se l'infezione avviene contemporaneamente alla vaccinazione o anche 3 giorni dopo di essa, l'uso del vaccino antipestoso resta senza alcuna azione e gli animali vaccinati muoiono d'infezione pestosa come quelli non vaccinati. Ciò è in pieno accordo col fatto generale, che, perchè l'immunità attiva si manifesti, è necessario un tempo più o meno lungo.

Nè è il caso d' invocare per l'infezione pestosa quello che succede per altre malattie infettive : e specialmente per la rabbia, in cui dato il lungo periodo d'incubazione, un'immunità attiva può anche essere prodotta dalle vaccinazioni in questo periodo.

Per la peste invece il periodo d'incubazione della malattia nell'uomo è molto breve. Riportiamo quì le idee principali sull'argomento.

Fin dal 1835 i medici francesi al Cairo ([1]) inocularono col sangue di pestosi 5 individui condannati a morte e videro manifestarsi la peste dopo 3 giorni. *Griesinger* ([2]) ritiene che nella peste il periodo d' incubazione sia normalmente di 2-5 giorni e come massimo in rari casi di 7 giorni; secondo *Montagu Lubbock* ([3]) esso oscilla da poche ore a 2 giorni, solo eccezionalmente a 3-4 giorni; secondo *Aoyama* ([4]) tra i 2-7 giorni; secondo *Yersin* ([5]) tra 4-6 giormi, secondo *Bitter* ([6]) tra 3-5 giorni; secondo *Weir* ([7]) tra 1-2 giorni; secondo *Wilm* ([8]) tra 3-6 giorni; secondo *Scheube* ([9]) 2-7 giorni; secondo *Albrecht e Ghon* ([10]) 4-7 giorni; secondo la Commissione tedesca ([11]) tra 1-6 giorni.

Siccome in tutta l'epidemia nelle Indie 1896-97 non fu potuto constatare nessun caso, in cui il periodo d'incubazione della peste nell'uomo si spingesse oltre il 10° giorno ([12]), così nella conferenza di Venezia fu ritenuto 10 giorni come il massimo del periodo d'incubazione della peste nell'uomo.

Possiamo quindi ritenere che il periodo d'incubazione della peste nell' uomo di regola oscilli tra i 2 e i 5 giorni: e

(1) *Gäetani Bey*. - Clot-Bey, Lachéze, Bulard cit. in Proust. - La défense de l'Europe contre la peste. - Paris 1897.

(2) *Griesinger*. - Infectionskrankheiten. In Virchow s' Handbuch d. spec. Path. u. Ther. 1864.

(3) *Montagu Lubbock*. - Plague in Andrew Dawidson's Hygiene a. Diseases of warm climates, 1893.

(4) *Aoyama*. - Rel. sulla epidemia di Peste a Hong-Kong. - Comun, della fac. med. della I. Università di Tokio 1895.

(5) *Yersin*. - La Peste bubonique á Hong-Kong. - Ann. de l'Inst. Pasteur 1894.

(6) *Bitter*. - Report of the Commission sent by the Egyptian Gov. to Bombay to study plague p. 60.

(7) *Weir*. - Report on the outbreak of bub. Plague in Bombay 1896-97 p. 57.

(8) *Wilm*. - Ueber die Pest-Epidemie in Hong-Kong im Jahre 1896. - Hyg. Rundschau 1897.

(9) *Scheube*. - Pest, Realencyklopädie der gesammten Heilkunde - von Eulenburg. Bd. 18. 3 Aufl.

(10) *Albrecht und. Ghon*. - l. c.

(11) *Deutsche Commission*. - l. c.

(12) The plague in India 1896-97. - Comp. by Nathan, p, 19.

solo in casi eccezionali possa spingersi al di là di questo termine.

Il fatto, che gli animali vaccinati e infettati con bacillo pestoso entro i primi 3 giorni dopo l'inoculazione del vaccino, morirono di setticemia pestosa come i controlli, rappresenta per noi un dato di grande importanza per la pratica delle vaccinazioni nell'uomo.

Esso, deve renderci molto cauti nell'applicare all'uomo le vaccinazioni antipestose, specialmente se ci troviamo innanzi a un'epidemia che ha preso larghe proporzioni.

E tanto più cauti e più circospetti bisogna essere, in quanto il fatto di vedere insorgere l'infezione pestosa, poche ore dopo la vaccinazione, non contribuisce certo nei medici e nelle masse a diffondere fiducia verso le vaccinazioni antipestose, nè a rendere le persone più docili nel sottomettersi a una pratica, per cui in generale si ha una forte e naturale ripugnanza.

Le vaccinazioni rappresentano, senza alcun dubbio, un mezzo prezioso di profilassi verso l'infezione pestosa; ma esse vanno usate in certi limiti e condizioni.

Il sistema seguito nelle Indie di vaccinare indistintamente e su larga scala tutte quelle persone che maggiormente si sospettò avessero potuto già aver contratta l'infezione, non trova nessun appoggio nell'esperimento. Nè le statistiche riportate dal *Bannermann*, nè le considerazioni fatte da questo autore possono distruggere i risultati delle esperienze stabilite negli animali e corrispondenti alle idee generali sulle vaccinazioni.

Noi crediamo che le vaccinazioni antipestose debbano essere praticate in primo tempo solo su quelle persone che si presuppone non abbiano in alcun modo contratto l'infezione. Per le persone sospette occorre un'immunità prontamente conferita: e questa non può essere data se non dal siero antipestoso.

Di quì la necessità di far seguire a queste ricerche sulle vaccinazioni antipestose una seconda serie di esperienze sull'azione protettiva del siero antipestoso, sui limiti e nelle condizioni in cui esso può essere adoperato con vantaggio dal sanitario nella profilassi di un'infezione pestosa.

PARTE SECONDA

SIEROPROFILASSI

I. Letteratura.

Le prime ricerche per ottenere un siero antipestoso furono istituite nel 1895 da *Yersin, Calmette e Borrel* (1) nell'Istituto *Pasteur* di Parigi, sotto la direzione di *Roux*.

Gli autori cominciarono col tentativo di immunizzare i conigli colle tossine del bacillo pestoso; ma i filtrati di culture in brodo si mostrarono senza alcuna azione sugli animali.

Inoculando invece i bacilli pestosi uccisi al calore di 58° per un'ora, essi riuscirono ad immunizzare i conigli verso dosi sicuramente mortali di bacillo pestoso vivente.

Gli autori poterono inoltre osservare, come il siero di sangue dei conigli immunizzati, mediante 3-4 inoculazioni di bacilli uccisi col calore, ripetute di 15 in 15 giorni, inoculato alla dose di 3-4 cmc. era sufficiente a salvare un altro coniglio dall'infezione prodotta da una quantità di bacillo pestoso sicuramente mortale.

Incoraggiati gli autori da questi risultati ottenuti nei conigli intrapresero senz'altro l'immunizzazione di un cavallo.

Essi adoperarono una cultura di peste che uccideva un topo in 2 giorni: e ad evitare gl'indurimenti e le ulcerazioni prodotte dalle inoculazioni sottocutanee, iniettarono direttamente

(1) *Yersin, Calmette et Borrel.- l. c.*

Roux. - Sur la peste bubonique et son traitement par le sérum antipesteux. Acad de Médecine. Séance 26 Janvier 1897. — Semaine médicale 1897.

i bacilli viventi e virulenti nel torrente circolatorio nella quantità di una cultura su agar. La reazione febbrile fu rapida ed intensa; essa durò una settimana e il cavallo si rimise lentamente. Dopo 20 giorni s'inoculò ancora la stessa quantità di cultura: la reazione fu intensa, ma di breve durata. D'allora gli autori iniettarono quantità maggiori ed a più brevi intervalli.

Dopo 6 settimane di tale trattamento fu fatto un salasso di saggio. Il siero mostrò azione preventiva e curativa sui conigli, sui topi e sulle cavie. Per proteggere un topo dall'infezione pestosa bastava inoculare $^1/_{10}$ di cmc. di questo siero 12 ore prima dell'infezione; ma per guarirlo bisognava inoculare 1-1$^1/_2$ cmc. di siero al massimo, 12 ore dopo l'infezione con bacillo pestoso vivente.

Gli autori notano il debole potere di questo loro siero antipestoso, ma dopo appena un'immunizzazione di 6 settimane non erano da aspettarsi risultati migliori. Essi ne traggono la speranza e l'augurio, che dopo un trattamento più lungo il valore del siero aumenterà notevolmente.

Ritornato il *Yersin* nell'Indocina, grazie al concorso del Governatore generale e del Ministero delle Colonie, fondò a Nha-Trang (Annam) un istituto per la produzione del siero antipestoso «*Istituito Pasteur di Nha Trang*». Ma questo laboratorio non era ancor finito, quando nel gennaio 1896 si risvegliò l'epidemia pestosa a Hong-Kong. Il *Yersin* quindi si dovette servire di 80 boccette di siero antipestoso spedite da Parigi, appartenenti al cavallo immunizzato nell'Istituto *Pasteur* ed ivi custodito.

Con questo siero il *Yersin* (1) trattò 23 ammalati di peste ad Amoy, di cui 21 guarirono e 2 morirono.

Il *Yersin* nota che altre esperienze sono necessarie per giudicare con esattezza il valore curativo del siero antipestoso. Nello stesso tempo fa osservare, che il siero adoperato ad Amoy era ben lontano dal possedere tutta l'attività che si può otte-

(1) *Yersin*. - Sur la peste bubonique (Sero - Thérapie). Ann. Inst. Pasteur 1897.

Rapport sur la peste bubonique de Nha - Trang (Annam) - Ann. Inst. Pasteur 1899.

nere. Bisogna sforzarsi di preparare uno siero antipestoso ancora più attivo.

Indipendentemente dall' impianto fatto da *Yersin* a Nha - Trang, innanzi all'iminente pericolo di un' invasione di epidemia pestosa in Europa, il *Roux* fondò a Garches, nei dintorni di Parigi, una scuderia con 25 cavalli per la produzione del siero antipestoso.

Il *Roux* si trovò, nell'accingersi ad immunizzare questi cavalli, innanzi ad una questione pratica molto grave. Finchè si trattò d'immunizzare un sol cavallo messo in una scuderia facilmente sterilizzabile sotto la sorveglianza del personale dell' Istituto Pasteur, si poterono inoculare grosse quantità di culture viventi di bacillo pestoso senza tema di accidenti spiacevoli. Ma la cosa cambiò di aspetto quando si dovette trattare un gran numero di cavalli in condizioni d'isolamento meno sicure.

Fu in base a tale considerazione, che il *Roux* nell' immunizzare questi cavalli si servì esclusivamente di culture morte di bacillo pestoso e di tossine delle medesime preparate su terreni artificiali di cultura.

Questo siero prodotto a Parigi dal *Roux*, mediante inoculazioni nelle vene di culture morte e di tossine, come quello prodotto a Nha-Trang dal *Yersin*, mediante le inoculazioni di culture viventi, nell'epidemia pestosa di Bombay non dettero risultati migliori di quelli avutisi col primo siero ottenuto a Parigi dal *Yersin*, *Calmette* e *Borrel.*

Ma non ostante il loro debole potere curativo, questi sieri mostrarono, usati a scopo profilattico, una notevole azione protettiva. Il *Metchnikoff* (1) al Congresso internazionale di Mosca affermò, che furono praticate più di 500 iniezioni preventive col siero antipestoso in individui viventi in pieno focolajo pestoso e che i risultati furono favorevoli.

Quantunque, dice il *Metchnikoff*, è sempre difficile giudicare in modo preciso dell'azione protettiva del siero antipestoso nell'uomo; pure in molti casi essa è così marcata, che non può

(1) *Metchnikoff.* - Sur la peste bubonique. - Ann. de l' Inst. Pasteur 1897.

essere messa in dubbio. In una famiglia di Parsi, 4 persone muoiono di peste, 4 sono guarite dal siero. Il resto della famiglia è trattata col siero a scopo protettivo e l'epidemia in questa casa si arresta subito.

Yersin in una lettera a *Roux* comunica il seguente caso: In una famiglia europea un domestico muore di peste: la figliuola è attaccata dalla peste, ma curata col siero guarisce. Allora il padre, la madre e altri quattro figli sono trattati col siero antipestoso a scopo protettivo. Nessuno di essi ammala di peste, mentre che su 5 domestici non trattati col siero 4 ammalarono di peste e morirono.

Il *Metchmikoff* conclude: in teoria la sieroterapia antipestosa deve essere considerata come una questione risoluta, ma nella pratica bisogna sforzarsi di ottenere dei sieri molto più attivi di quelli adoperati finora e sopra tutto molto più antitossici di quelli utilizzati nella campagna antipestosa nelle Indie.

Anche il *Wilm* (1) adoperò il siero antipestoso *Yersin* nell'epidemia di peste di Hong-Kong ed afferma che l' azione di detto siero è pronta ed efficace nei casi in cui s' interviene all' inizio della malattia.

Intanto anche in Russia innanzi al pericolo imminente di un' invasione dell' epidemia pestosa, il Consiglio dell' Istituto Imperiale per la Medicina sperimentale a Pietroburgo, fondò un laboratorio per la produzione del siero antipestoso.

Il *Wladimiroff* (2) a cui fu affidata la direzione di questo istituto, procedette all'immunizzazione di 26 cavalli, inoculando nelle vene dosi sempre crescenti di culture morte di bacillo pestoso. Egli cominciò coll' inoculare nelle vene una cultura su agar emulsionata in brodo e uccisa per 1 ora a 58°; e aumentò la dose secondo la reazione data dal cavallo. Dei 26 cavalli sottoposti a questo procedimento d' immunizzazione, solo in due ottenne il *Wladimiroff* un siero dell'efficacia di quello di *Yersin*.

(1) *Wilm*. — l. c.

(2) *Wladimiroff*. — Zur Technik der Pestserumbereitung (Wratsch 1897). Ref. Centr. f. Bakt. Bd. XXII 1897.

Partendo dal fatto che l'immunizzazione dei cavalli mediante culture viventi è molto incomoda e pericolosa, cercò il *Gabritschewsky* (1) un altro metodo più sicuro. In questo senso sono di grande interesse le ricerche intese a ottenere dal bacillo della peste delle sostanze immunizzanti e tossiche mediante la plasmolisi dei batteri.

Per ottenere la plasmolisi dei batteri pestosi, il *Gabritschewsky* ricorse all'azione della glicerina, procedendo nel modo seguente: piastre di agar di 20–30 cmq. furono infettate con cultura di peste in brodo e lasciate sviluppare per 24–48 ore in termostato, per ottenere lo sviluppo di una densa patina. Raschiata accuratamente questa patina, fu trasportata con una spatola di platino in tubi contenenti 2 cmc. di glicerina. Lasciati questi tubi per 24 ore in termostato a 37° si formò una massa torbida, mucilagginosa, che fu diluita in egual quantità di brodo e inoculata sotto cute ai cavalli. Nel punto d'inoculazione si formò di solito un considerevole infiltramento con ulcerazione della pelle e la temperatura salì fino a 39°, 2. Inoculata questa sostanza nelle vene, la temperatura salì fino a 40°, per scendere al normale dopo 24–48 ore.

Anche in Italia per iniziativa del prof. *Lustig* (2) venivano fatte nell' Istituto di Patologia generale di Firenze delle ricerche sulla produzione del siero antipestoso.

Abbiamo già detto, come il Lustig in collaborazione del suo ajuto, dot. *Galeotti*, riuscì ad estrarre dai corpi del bacillo pestoso, mediante un processo chimico, una sostanza immunizzante, che va sotto il nome di *Vaccino antipestoso Lustig* e che noi abbiamo già minutamente descritta.

Incoraggiato dai risultati ottenuti nei piccoli animali da esperimento (topo, ratto, coniglio) il *Lustig* si accinse all' immunizzazione di un cavallo col suo vaccino antipestoso.

Cominciò coll'inoculazione di 5 centgr. di sostanza attiva sotto

(1) *Gabritschewsky.* — Ueber die Gewinnung des Pestserum. - Russ. Arch. f. path. Klin. Med. u. Bakt. 1897. - Ref. Centr. f. Bakt. Bd. XXII. 1898.

(2) *A. Lustig.* — Sieroterapia e vaccinazioni preventive contro la peste bubbonica, Torino 1899.

la cute della spalla. Dopo 24 ore si manifestò al punto d'iniezione un forte edema dolente alla pressione, con 39°. di temperatura rettale e inappetenza. Dopo 6 giorni i fenomeni generali erano scomparsi.

Trascorsi altri 3 giorni s'inocularono 14 centgr. di sostanza attiva sciolta in 40 cmc. di soluzione alcalina: si ebbe edema dolente al punto d'inoculazione e temperatura rettale di 40°.

Dopo 6 giorni s'inocularono 16 centgr. di sostanza attiva: i fenomeni generali furono più lievi e di breve durata.

Dopo una settimana s'inocularono ancora 22 centgr. di sostanza attiva. Trascorsa ancora un'altra settimana, si praticò un salasso di prova: ma per ottenere un siero attivo bisognò ricorrere ancora all'inoculazione sottocutanea di altri 40 centgr. di vaccino.

Il siero di questo cavallo mostrò nei ratti e nei topi azione curativa e profilattica.

Durante la epidemia di peste a Bombay il siero antipestoso *Lustig* fu sperimentato sull'uomo e sugli animali (scimmie) dai medici locali, dai membri delle diverse Commissioni europee inviate in India e dallo stesso *Lustig*, che si recò in India per propria iniziativa coi dottori *Galeotti* e *Malenchini*. Noi qui terremo conto in particolar modo delle ricerche sperimentali istituite sugli animali, sia per l'indole di questo nostro lavoro, sia per il fatto che gli esperimenti sugli uomini sono sottomessi a molte cause che ne possono alterare i risultati (gravità dell'infezione, malattie concomitanti, stato generale degli ammalati, epoca in cui è intrapreso il trattamento). Lo stesso *Lustig* accenna al fatto, che in India la sieroterapia antipestosa non darà mai risultati complettamente soddisfacenti, perchè la maggior parte degl'individui che ammalano di peste sono già in condizioni di grave esaurimento per cattiva nutrizione.

Ad ogni modo il *Lustig* [1] dall' uso fatto del suo siero nel-

(1) *A. Lustig.* - Risultati delle ricerche fatte in India negli animali e nell' uomo intorno alla vaccinazione preventiva contro la peste bubbonica e alla sieroterapia. Pubblicazioni del R. Istituto sup. di Firenze 1897.

Galeotti. - Note e statistiche nel trattamento profilattico e curativo della peste bubbonica in India. *Lo sperimentale* dic. 1900.

l' « Arthur Road Hospital » potè constatare i benefici effetti di esso sui malati di peste: abbassamento della temperatura, miglioramento delle condizioni cardio-vascolari, riduzione del bubbone ecc.

Consigliati dal prof. *Lustig*, i dottori *Galeotti e Malenchini* (1) istituirono col siero *Lustig* degli esperimenti sulle scimmie. Essi però si sono limitati a studiare l'azione curativa di detto siero su cinque scimmie ed hanno dimostrato, che il siero antipestoso *Lustig* può salvare gli animali da certa morte, usato quando l'organismo non ha ancora esaurita la sua forza di riserva per combattere i microrganismi.

Ricominciata, dopo la stagione delle piogge, l'epidemia di peste a Bombay, la municipalità di questa città si rivolse al prof. *Lustig* per avere siero antipestoso in grande quantità. Nell' Istituto di patologia generale di Firenze furono allora trattati cinque cavalli col vaccino *Lustig*.

Con questo siero *Galeotti* e *Polverini* (2), recatisi in India, stabilirono i loro esperimenti nell' « Arthur Road Hospital » di Bombay. In quanto ai risultati ottenuti rimandiamo alla relazione dei dottori *Galeotti* e *Polverini*, ove essi si trovano ampiamente descritti. Questi risultati si riferiscono unicamente al valore curativo del siero antipestoso preparato a Firenze col metodo di vaccinazione *Lustig*.

Beinarowitsch (3) sperimentò sui topi col siero antipestoso preparato a Pietroburgo dal *Wladimiroff*. Egli potè dimostrare che 0. 1 cmc. di siero era capace di conferire ai topi un' immunità passiva di sei giorni: e 0. 2 cmc. un' immunità di due settimane.

Durante l' epidemia pestosa di Bombay, la Commissione russa istituì delle ricerche col siero antipestoso sulle scimmie. I risultati di questi esperimenti sono riferiti, sotto forma di con-

(1) *Galeotti* e *Malenchini*. - l. c.

(2) *Galeotti* e *Polverini*. - Sui primi 175 casi di peste bubbonica trattati nel 1898 in Bombay col siero preparato nel Laboratorio di Patologia generale in Firenze - Pubblic. del R. Istituto sup. di Firenze.

(3) *Beinarowitsch*. - Zur Frage über die Immunität gegen Beulenpest - Arch. biol. Wissens. Bd. VI 1898. Ref. in Central. f. Bakt. Bd. XXV 1899.

clusione, nella breve comunicazione pubblicata sugli Annali Pasteur da *Wyssokowitz* e *Zabolotny* (1).

Secondo questi autori il siero antipestoso *Yersin*, può guarire le scimmie infettate di peste, se il trattatamento non comincia troppo tardi e se la dose di siero adoperata non è troppo scarsa. Esso inoculato preventivamente, conferisce agli animali, un'immunità che non dura più di dieci o quattordici giorni.

Anche la *Commissione tedesca* (2) sperimentò in India sulle scimmie il siero antipestoso *Yersin*.

Essa potè constatare in detto siero una notevole azione protettiva. Infatti 10 cmc. di siero salvarono dall' infezione i macachi a cui 24 ore dopo fu inoculato sotto cute 1 cmc. di cultura in brodo virulenta. Questa stessa dose di siero restò poi senza alcun effetto per le scimmie grigie (Semnopitecus entellus).

Secondo la Commissione tedesca questo fatto, che animali più sensibili dei macachi verso la peste non acquistarono nessuna immunità passiva coll' uso del siero, ci deve rendere molto cauti nel trasportare all' uomo i risultati ottenuti nelle ricerche sperimentali. La Commissione tedesca anzi crede, che dall' uso del siero antipestoso come mezzo protettivo nell' uomo, non si deve aspettare grandi successi.

L' immunità conferita ai macachi dal siero antipestoso fu di breve durata. Dopo quattro giorni essa era ancora completa: ma dopo otto giorni era già diminuita e dopo dodici giorni scomparsa del tutto.

La Commissione tedesca potè anche constatare nel siero antipestoso *Yersin* un notevole potere curativo. Infettati infatti i macachi con una $^1/_2$ ansa di cultura virulenta di peste e inoculati 6, 12, 24 ore dopo 10 cmc. di siero antipestoso, ammalarono di peste, ma si salvarono: se il siero invece veniva inoculato più tardi (48 ore dopo) gli animali morivano come i controlli.

Il *Dieudonnè* (3) afferma che senza alcun dubbio il siero antipestoso di Parigi ha negli animali un notevole potere profilattico

(1) *Wyssokowitz* e *Zabolotny*. - l. c.
(2) *Deutsche Commission* - l. c.
(3) *Dieudonnè*. - l. c.

e curativo. È possibile, secondo questo autore, che coll' uso di siero più fortemente attivo, la cui produzione è sicuramente una questione di tempo, i risultati possano diventare migliori.

E coll' intento di raggiungere questo scopo, alcuni ricercatori ricorsero a diversi metodi per la produzione del siero antipestoso.

L' *Uschinski* (1), in una lezione tenuta nel maggio 1897 nell'Università russa di Warschau, accennò ad alcune esperienze fatte in collaborazione del *Brunner* sulle ptomaine della peste. Ma gli animali immunizzati con queste ptomaine, che, secondo l' autore si formano nelle culture in brodo per distruzione delle tossine già formate, diedero un siero che non fu capace di difendere gli animali da esperimento dalle intossicazioni, che si accompagnano all' infezione pestosa.

Nel luogo classico per le ricerche sui sieri curativi, nell' Istituto d' Igiene di Marburg, sotto la direzione del prof. *Behring* istituì il *Wernicke* (2) degli esperimenti sul siero antipestoso.

L' autore si propose di studiare sulla possibilità di ottenere un siero antipestoso con un procedimento diverso da quello usato nell' Istituto *Pasteur* di Parigi. Egli ricercò con diverse vie di scoprire se esistesse per caso un veleno pestoso solubile. Effettivamente l' esistenza di una tale tossina fu potuta constatare: l' essudato pleurale infatti di una cavia infettata di peste, uccise in poche ore i topi alla dose di 1 cmc. Ad ogni modo il *Wernicke*, come gli altri autori, non trovò mai nelle culture liquide filtrate un veleno specifico sciolto. Egli perciò per ottenere le tossine si rivolse al trattamento chimico e fisico dei corpi bacillari. Mediante disseccamento delle patine di culture su agar, centrifugazione ed estrazione con soluzione di glicerina, fu ottenuto un veleno che iniettato nel peritoneo alla dose di 1:25000 del peso delle cavie, uccideva gli animali.

(1) *Uschinski.* - Aetiologie und Serotherapie der Pest - Refer.Centr. f. Bakt. Bd. XXIV. 1898

(2) *Wernicke.* - Ueber Immunisierungsversuche bei der Bubonenpest. - Sitzungsber. d. Gesell. z. Beförderung d. gesammten Naturwissenschaften zu Marburg. 1898.

Con altro metodo di preparazione fu ottenuto un veleno, che uccideva gli animali alla dose di 1 : 3000 tra 24 e 48 ore.

Con queste polveri velenose estratte dai bacilli pestosi, furono immunizzati dei grossi animali (bovi, cavalli, capre) mediante inoculazione sottocutanea di piccole quantità. Ma l' autore fu costretto ad interrompere queste ricerche, perchè negli animali si produssero nel luogo d' inoculazione dei focolai di suppurazione, che durarono per mesi.

Il *Wernicke* ritornò quindi alle culture in brodo. Mediante il lavaggio delle ceneri di culture di peste in brodo vecchie di otto o dodici settimane, uccise con formalina al 0. 25 $^0/_0$ o con toluolo al 5 $^0/_0$, si ricavò un liquido chiaro, di cui 0. 1 cmc. uccideva i topi bianchi. Da questo liquido mediante precipitazione con solfato di ammonio fu ottenuto un veleno solido, che uccideva i topi nella dose di 1 : 72000, ma non produceva nessuna alterazione nelle cavie. Con questa sostanza furono trattate delle capre con dosi sempre crescenti. In esse s' inoculò una quantità complessiva di veleno capace di uccidere 40.000 topi. Le capre reagirono all' inoculazione del veleno : ma nel loro siero non si trovò nessuna sostanza capace di neutralizzare l' azione di detto veleno nei topi.

Secondo il *Markl* (1) un siero antipestoso efficace deve essere antitossico e battericida. Di qui una lacuna nella preparazione del siero antipestoso, perchè inoculando i bacilli pestosi uccisi o vivi si produce solo un siero battericida.

Il *Markl* credette di riempire questa lacuna, colla dimostrazione di sostanze tossiche nei filtrati di vecchie culture in brodo di bacillo pestoso (culture di due mesi). Allo scopo di ottenere un siero battericida e antitossico, egli propose d' immunizzare i cavalli con metodo combinato : inoculazione contemporanea di corpi batterici e di tossine liquide.

Con la tossina liquida, ricavata dalle vecchie culture di bacillo pestoso in brodo, il *Markl* stabilì delle ricerche in un gatto

(1) *Markl.* - Beitrag zur Kenntniss der Pesttoxine - Centr, f. Bakt. Bd. XXIV. 1898.

e vide come il siero di sangue di questo animale trattato colla tossina solubile mostrasse proprietà antitossiche verso di essa, ma nessun potere battericida verso il bacillo della peste.

Il dott. *Symmers* (1) in una relazione al Direttore generale dei servizi sanitari al Cairo, riferisce sugli esperimenti d'immunizzazione da lui istituiti nei cavalli per la produzione del siero antipestoso nell' Istituto di Abbassieh (Egitto).

Furono immunizzati quattro cavalli: uno fu trattato con culture in brodo sterilizzate per un'ora a 60°: due con emulsioni in brodo di culture su agar e uccise per un' ora a 60°: e uno con bacilli viventi: culture di 3 - 8 giorni su agar emulsionate in brodo sterile.

L' autore assicura di avere ottenuto del siero di potere eguale a quello di *Yersin*.

Il siero antipestoso intanto veniva adoperato in diverse epidemie pestose con risultati diversi. Così mentre il *Tidswell* (2) nell' epidemia di Sydney non ebbe risultati notevoli dall' uso del siero antipestoso a scopo terapeutico; buoni effetti invece ebbe *Zabolotny* (3) nell'epidemia di peste nella Mongolia orientale.

Scoppiata nel 1899 l' epidemia di peste ad Oporto, *Calmette* e *Salimbeni* (4) si recarono in Portogallo per sperimentare il siero antipestoso *Yersin*, che nelle Indie aveva dato poco buoni risultati. Gli autori cominciano col far notare, come ad Oporto trovarono l' ambiente poco ben disposto verso l'efficacia del siero *Yersin*. Essi quindi credettero opportuno per eliminare lo scetticismo dei medici curanti, di stabilire degli esperimenti di laboratorio alla presenza di una commissione internazionale.

In queste esperienze gli autori dimostrarono l' azione protettiva del siero sui topi alla dose di 0. 02 cmc. e sulle scimmie alla dose di 2 cmc.

(1) *Symmers*. - Report on Preparation of Plague Serum - Centr. f. Bakt. Bd. XXV 1899.

(2) *Tidswell*. - l. c

(3) *Zabolotny*. - La peste in Mongolie orientale

(4) *Calmette e Salimbeni*. - l. c.

Furono stabilite anche delle ricerche sul valore terapeutico del siero. Si riuscì a salvare i topi da inoculazione di materiale infettante sicuramente mortale, mediante l' inezione di 0. 25 cmc. di siero fino a 14 ore dopo l' infezione.

Nei macachi poterono il *Calmette* e *Salimbeni* dimostrare nelle forme gravi d'infezione, i buoni risultati delle inoculazioni endovenose di siero.

Inoltre nell' epidemia di Oporto furono trattati col siero 140 pestosi, i quali diedero una mortalità del 14. 78 $^0/_0$: mentre nei casi non trattati la mortalità raggiunse i 65 $^0/_0$.

Il siero antipestoso fu anche dagli autori adoperato a scopo preventivo alla dose di 5 cmc. Furono trattate 600 persone con buoni risultati. Gli autori notano, come l' immunità in questo modo si conferisca rapidamente, ma sia fugace. Essa infatti non dura più di quindici giorni,

Secondo il *Kossel* e *Frosch* (1) dalla peste di Oporto, nessun nuovo insegnamento si può trarre per l' efficacia del siero antipestoso. Le cento inoculazioni di siero *Yersin* fatte dai medici francesi a scopo profilattico non sono bastevoli per farci formare un giudizio in proposito.

Usufruendo anche dell' epidemia pestosa di Oporto, il *Metin* (2) studiò l' azione protettiva e curativa del siero di sangue dei convalescenti di peste sugli animali da esperimento.

Egli sperimentò con tre sieri appartenenti a tre individui guariti dall' infezione pestosa. Furono inoculate delle cavie con 1 cmc. di siero e 24 ore dopo furono infettate con $^1/_2$ cmc. di cultura di peste in brodo. Questi animali si salvarono, mentre i controlli morirono in tre o quattro giorni.

Ritornato a Parigi, nell'Istituto *Pasteur*, il *Mettin* cogli stessi sieri fece le medesime esperienze sui topi, ma ebbe risultati peggiori. I topi inoculati col siero ed infettati di peste 24 ore dopo sopravvissero solamente pochi giorni ai controlli. Siccome queste esperienze furono fatte 3 mesi dopo la raccolta dei sieri, è probabile

(1) *Kossel und Frosch.* - l. c.

(2) *Metin.* - Quelques expériences sur la peste a Porto - Ann. Inst. Pasteur 1900 XIV.

che essi avessero in questo frattempo perduto della loro efficacia. Oltre i lavori sperimentali comparvero intanto numerose comunicazioni sull'efficacia curativa e profilattica del siero antipestoso nell'uomo.

Il *Choksey* (1) assicura che il siero antipestoso *Lustig*, esercita sempre una benefica azione sul decorso dell'infezione pestosa nell'uomo.

Il *Clemow* (2) invece non ottenne buoni risultati nè dall'uso del siero *Yersin*, nè dall'uso del siero *Lustig*.

Il *Merveilleux* (3) adoperò il siero *Yersin* in 15 casi dei 53 ammalati di peste nel porto di Reunion. Nei casi trattati ebbe una diminuzione di mortalità rispetto ai casi non trattati.

Iohn Brownlee (4) riferisce sui risultati ottenuti a Glasgow col siero antipestoso *Yersin* nell'epidemia di peste del 1900. Dopo aver notato che la peste di Glasgow mostrò un carattere benigno, assicura che l'inoculazione di 10 cmc. di siero antipestoso, se non con sicurezza, pure in molti casi protesse dalla malattia. E se, non ostante l'inoculazione del siero, si manifestò la malattia, essa assunse decorso più benigno.

L'autore ascrive al siero antipestoso anche azione curativa, solo quando è inoculato direttamente nelle vene.

Nella Conferenza scientifica (5) tenuta a Berlino nell'ottobre 1899, il *Pfeiffer* affermò, come dagli esperimenti sugli animali risulti che l' immunità passiva contro la peste si conferisce ad essi solo mediante l'uso di grosse dosi di siero. Quest'immunità scompare dopo pochi giorni. Egli quindi dubita dei risultati ottenuti dai ricercatori francesi, che con 10 cmc. di siero antipestoso si possa conferire all'uomo un'immunità che duri quattro settimane. Il *Pfeiffer* ad ogni modo riconosce che l'uso del siero antipestoso ha un grande interesse pratico.

(1) *Choksey*. — Pestbehandlung durch das Serum von Lustig. Ref. Münch. med. Woch.

(2) *Clemow*. — The serum treatment of plague. the Lancet 1899.

(3) *Merveilleux*. — Brit, med. Journal. Ref Münch. med. Woch. 1901.

(4) *Iohn Brownlee*. — The serum treatment of plague. the Lancet. 1901.

(5) l. c.

Il *Lignieres* (1) riferisce alcune osservazioni da lui fatte nella sua missione a Rosario e a Buenos-Ayres durante l'epidemia pestosa del 1899-1900. Egli afferma che il siero *Roux-Yersin* inoculato nelle vene in grande quantità (40-60 cmc.) riduce certamente la mortalità. In quanto alle iniezioni preventive, l'autore le ha praticate più volte sopra di sè stesso e su tutto il personale del suo laboratorio: esse si sono mostrate innocue ed efficaci.

Il *Kolle* (2), a completare le ricerche della Commissione tedesca, che aveva provato il siero antipestoso sulle scimmie, istituì delle esperienze sui ratti e sulle cavie col siero antipestoso di Parigi.

Ecco in breve i risultati delle sue esperienze. Dieci ratti furono inoculati con 4 cmc. di siero antipestoso: 2 di questi furono infettati con cultura pura di peste sulla congiuntiva dopo 3 giorni; 2 dopo 6; 2 dopo 9; 2 dopo 12 e 2 dopo 20 giorni. I primi 6 ratti restarono in vita: gli altri 4 ammalarono e morirono di peste. Il siero antipestoso quindi conferisce ai ratti una immunità, ma questa non è di lunga durata.

Sei ratti furono inoculati con $^1/_{100}$ di ansa di cultura di bacilli pestosi e dopo 18 ore con 3 cmc. di siero antipestoso. Tutti i 6 ratti ammalarono e morirono di peste: in 3 il decorso della malattia fu allungato. Di 8 ratti invece che ricevettero contemporaneamente $^1/_{100}$ di ansa di cultura e 3 cmc. di siero, uno solo morì di peste; gli altri restarono sani.

Il *Kolle* in base a questi risultati ritenne quindi, che il siero antipestoso *Yersin*, fosse dotato di un'azione specifica protettiva; ma di nessuna azione curativa.

Nelle cavie ottenne il *Kolle* risultati molto più sfavorevoli. Ma anche in questi animali fu messa in evidenza, quantunque in quantità minore che nei ratti, l'azione protettiva del siero antipestoso *Yersin*.

(1) *Lignieres.* — Sur le bacille pesteux et les iniections intravéneuses massives de Sérum Roux, Yersin dans le traitement de la peste. Ann. Inst. Pasteur 1901 Tom. XV.

(2) *Kolle.* — Ueber die Pest. D. med. Woch. 1902.

Molto interessanti sono le ricerche istituite sul siero antipestoso di Parigi in diversi istituti delle Università tedesche per incarico del Ministero della Istruzione. Queste ricerche sono state pubblicate tutte insieme nel Klinisches Iahrbuch (1) e rappresentano un documento molto importante per l'efficacia del siero antipestoso di Parigi giudicata dal lato sperimentale.

Apre la serie delle relazioni un rapporto del *Kolle* sugli esperimenti eseguiti nell' Istituto delle malattie infettive a Berlino.

Come animali da esperimento furono adoperati ratti, topi e cavie. Il siero fu inoculato prima, contemporaneamente e dopo il materiale infettante. La dose di siero adoperata fu: per i ratti, da 0.5 a 4 cmc., per le cavie da 0.5 a 6 cmc., e per i topi da 0.5 a 2 cmc. L'infezione fu praticata in parte con culture di peste su agar emulsionate in brodo: in parte con succo di organi e con sangue di animali morti di peste, in cui microscopicamente era stato constatato il bacillo della peste in cultura pura.

Questo materiale fu inoculato per diverse vie:

1) iniezione sottocutanea;
2) trasporto del materiale infettante in saccoccie cutanee:
3) inoculazione endoperitoneale;
4) trasporto sul sacco congiuntivale;
5) sfregamento col materiale infettante sulla cute abrasa.

Furono usate culture virulentissime e culture poco virulente di bacillo pestoso.

I risultati di queste ricerche sono illustrati in numerose tabelle. Noi quì terremo conto delle conclusioni a cui il Kolle arriva.

I risultati furono diversi secondo che il siero fu inoculato prima o dopo l'infezione coi bacilli della peste: e secondo che l'infezione fu prodotta con culture virulentissime o poco virulente.

(1) *Berichte* über die Wertbestimmung des Pariser Pestserums im Auftrage des Herrn Kultusministers erstattet von Prof. R. Koch, E. v. Behring, R. Pfeiffer, W. Kolle, Martini. Klin. Iahrbuch Bd. IX. 1902.

Inoculato il siero contemporaneamente o dopo l'infezione prodotta con materiale virulentissimo, il *Kolle* ebbe i risultati riassunti nella seguente tabella:

SPECIE di animale	Siero antipestoso		Siero normale		Controlli	
	vivono	muoiono	vivono	muoiono	vivono	muoiono
Topi	5	41	1	25	0	16
Ratti	3	21	1	8	0	1
Cavie	0	20	0	9	0	5

Quantunque non possa il *Kolle* negare al siero antipestoso di Parigi un'azione specifica, pure in base ai risultati di queste ricerche egli assegna ad esso un potere curativo quasi nullo.

Inoculato il siero 24 ore prima dell'infezione si ebbero risultati migliori. Essi sono riassunti nella seguente tabella:

SPECIE di animali	Siero antipestoso		Siero normale		Controlli	
	vivono	muoiono	vivono	muoiono	vivono	muoiono
Topi	7	7	1	11	....	....
Ratti	6	4	1	8	....	....
Cavie	3	15	0	4	....	....

In base a questi risultati il *Kolle* ascrive al siero antipestoso di Parigi una notevole azione protettiva. Ma l'immunità conferita dal siero antipestoso non è di lunga durata, nè completa, nè può ottenersi in tutti gli animali.

In una seconda relazione del *Kolle e Martini*, gli autori, fondandosi sopra una serie di ricerche eseguite nell'Istituto delle malattie infettive di Berlino, arrivano alla seguente conclusione: al siero antipestoso di Parigi bisogna riconoscere sicuramente delle proprietà utili, che possono essere sfruttate in tutti quei casi in cui è necessario negli uomini produrre rapidamente un'azione protettiva.

Segue la relazione sugli esperimenti fatti dal *Römer* e dal *Behring* nell'Istituto d'igiene e di terapia sperimentale di Marburg.

Il v. *Behring* e il *Römer* divisero le loro ricerche in due serie:

1) azione del siero mescolato col materiale pestoso infettante:

2) azione del siero adoperato separatamente dal materiale infettante: e propriamente *a*) se prima è inoculato il siero e dopo il materiale pestoso infettante: *b*) se il siero è inoculato dopo l'infezione.

Gli autori cominciarono collo stabilire la dose minima mortale della cultura di peste da essi adoperata per infettare i topi. Da una serie di ricerche risultò che 0,000001 di cmc. di una cultura di peste su agar emulsionata in 1 cmc. di acqua uccideva un topo in 4 giorni.

Inoculando sotto cute una miscela di 0.1 di siero e di una diluzione al disotto di 0.001 di emulsione di bacillo pestoso (dopo $^1/_2$ ora di riposo della miscela), si salvò il topo, che invece moriva se la quantita di materiale infettante era maggiore.

Inoculando il siero ed infettando il topo 30 minuti dopo, si ottenne un significante ritardo nella morte dell'animale.

Inoculando i topi col siero dopo l'avvenuta infezione, gli autori notarono da parte del siero antipestoso di Parigi un inaspettato valore terapeutico.

In ultimo chiude la serie delle relazioni un rapporto del

Pfeiffer sulle esperienze da lui fatte nell'Istituto d'Igiene dell'Università di Königsberg.

Il *Pfeiffer* sperimentò sui topi, sulle cavie e sui ratti e arrivò alle seguenti conclusioni:

1) delle tre specie di animali su cui si sperimentò (topi, cavie e ratti), solo i ratti servono per dimostrare l'azione specifica del siero antipestoso;

2) ratti di circa 120 grammi possono, con 0,3 cmc. di siero al minimo, essere sicuramente protetti verso l'infezione di una dose di bacillo pestoso, capace di uccidere in 48-60 ore gli animali da controllo.

Nelle cavie e nei topi ebbe il *Pfeiffer* solo un ritardo nella morte in paragone ai controlli.

In un lavoro pubblicato sulla « Deutsche medicinische Wochenschrift » del 1902 il *Kolle e il Martini* (1) ricapitolano i risultati di una lunga serie di esperienze eseguite nell'Istituto delle malattie infettive di Berlino e già pubblicate in parte nel « Zeitschrift für Hygiene » in parte nel « Klinisches Iahrbuch ».

Gli autori negano al siero antipestoso di Parigi ogni potere curativo. Inoculato negli animali 24 ore dopo l'infezione non ha nessuna azione. Esso invece possiede senza alcun dubbio proprietà protettive: e conferisce agli animali da esperimento un'immunità passiva, che non è di lunga durata, nè compare egualmente in tutti gli animali.

Applicando il fenomeno di *Pfeiffer*, gli autori hanno potuto dimostrare nel siero antipestoso di Parigi l'esistenza di sostanze battericide.

In un altro lavoro il *Martini* (2) ha dimostrato che il siero antipestoso non ha nessuna azione, nè protettiva, nè curativa, nelle forme di peste polmonare. Secondo il *Martini* nei casi di pneumoniti pestose si può ricorrere all'uso del siero antipestoso solo allo scopo di tranquillizzare lo spirito « psychischen Beruhigung »

(1) *Kolle und Martin.* — *i* Ueber Pest. D. med. Woch. 1902 Nri. 1. 2, 4

(2) *Martini.* — Ueber die Wirkung des Pestserums bei experimenteller Pestpneumonie. Klin. Iahrb. Bd. X. 1902

L'Hetsch ed *Otto* [1] istituirono degli esperimenti sui ratti per studiare l'azione del siero antipestoso sugli animali infettati di peste per la via orale. Per ottenere tale scopo gli animali furono nutriti o con cadaveri di topi morti di peste o con latte in cui si emulsionarono culture su agar di bacilli pestosi vivi e virulenti.

Anche nell' infezione conferita per la via orale il siero antipestoso inoculato sottocute spiegò un' azione protettiva, ma nessuna azione curativa.

Il *Kolle* e l' *Otto* [2] hanno istituite delle ricerche comparative sui 3 sieri antipestosi seguenti:

1) siero prodotto secondo il metodo *Lustig* nel Laboratorio municipale di Bombay;

2) siero dell' Istituto *Pasteur* di Parigi;

3) siero prodotto dell' Istituto di Berna.

Gli autori hanno diviso le loro ricerche in diverse serie:

1) iniezione del siero 24 ore prima dell' infezione;

2) contemporaneamente all' infezione;

3) 6 ore dopo l' infezione;

4) 18 ore dopo l'infezione.

In tavole grafiche gli autori riportano i risultati delle loro ricerche, che possono essere così riepilogate: nei ratti i tre sieri antipestosi spiegarono una notevole azione protettiva. Iniettando il siero 24 ore prima si hanno risultati meno buoni che iniettando contemporaneamente al materiale infettante. Nei topi invece con tutti e tre i sieri si ebbero risultati sfavorevoli, riuscendo solo in alcuni casi a ritardare la morte.

Gli autori hanno potuto constatare che anche inoculando il siero 6 ore dopo l' infezione si possono salvare gli animali, quantunque la percentuale sia molto minore che nel trattamento col siero contemporaneo all' infezione.

Secondo il *Kolle* e l'*Otto* il siero di Berna è da preferirsi a quello di Parigi: e questi due a quello *Lustig*.

(1) *Hetsch und Otto.* — Ueber die Wirkung des Pestserums bei experimenteller Futterungspest. Klin. Iahrb. Bd. XI. 1903.

(2) *W. Kolle und R. Otto.* - Vergleichende Werthprüfungen von Pestserum verschiedener Herkunft. Zeitschr. f. Hyg. Bd. XL 1902.

Contro questa affermazione e in generale contro i risultati ottenuti dal *Kolle* ed *Otto* col siero antipestoso preparato secondo il metodo *Lustig* nel Laboratorio municipale di Bombay, si leva il *Polverini* (1) direttore in quel tempo di questo Istituto.

Il *Polverini* comincia col far notare che i risultati ottenuti coi sieri antipestosi nei Laboratori furono varii secondo il siero adoperato e secondo la cultura usata come materiale infettante. Dopo aver rilevato i risultati ottenuti dal Kolle ed *Otto* col siero antipestoso indiano, il *Polverini* osserva come detto siero non fu mandato da lui, ma in parte dal Dottor *Massina* e in parte dall'Ufficiale sanitario di Bombay. Egli critica ad ogni modo i risultati degli autori tedeschi ed insiste sulla necessità, nella prova di un siero antipestoso, di usare quantità infettanti di bacillo della peste non di molto superiore alla dose minima mortale.

Prima di chiudere questa esposizione bibliografica dei lavori più importanti sui sieri antipestosi, dobbiamo dichiarare, come abbiamo tralasciato di citare tutti i lavori, in cui sono riferiti i risultati ottenuti con l'uso del siero sull'uomo a scopo curativo.

In queste nostre ricerche ci siamo solo occupati del potere protettivo del siero e abbiamo cercato cogli esperimenti sugli animali di stabilire i limiti e le condizioni, in cui questo può con vantaggio essere adoperato nella profilassi dell'infezione pestosa nell'uomo. Abbiamo quindi tenuto conto quasi esclusivamente delle ricerche sperimentali istituite sull'argomento.

II. Sieri antipestosi e loro preparazione.

I sieri antipestosi, che oggi maggiormente vanno in commercio, sono 3: il siero dell'Istituto *Pasteur* di Parigi: il siero dell'Istituto sieroterapico di Berna: il siero *Lustig* preparato nel Laboratorio municipale di Bombay.

(2) *Polverini.* — Serumtherapie gegen Beulenpest. Münch. med. Woch. 1903. N. 15.

a) *Siero antipestoso dell' Istituto Pasteur di Parigi.*

Appena il *Yersin*, nell'epidemia pestosa di Hong-Kong nel 1895, scoprì e studiò il bacillo della peste, a Parigi nell' Istituto *Pasteur*, il *Borrel* e *Calmette*, sotto la direzione del *Roux*, istituirono delle ricerche d' immunizzazione sui conigli allo scopo di ottenere un siero specifico curativo. Ritornato il *Yersin* in Francia, si associò agli altri nelle ricerche e fu immunizzato un cavallo.

Per l' immunizzazione di questo cavallo si usarono le inoculazioni endovenose di dosi sempre crescenti di culture vive e virulente di bacillo pestoso su agar emulsionate in brodo.

Secondo il *Roux* lo stesso risultato si può ottenere immunizzando gli animali mediante inoculazioni endovenose di culture di peste su agar emulsionate in brodo e uccise per un ora a 60°. Con questo procedimento furono appunto immunizzati dal *Roux* 25 cavalli nell' Istituto sieroterapico di Garches nei dintorni di Parigi.

Noi non abbiamo potuto trovare nessuna pubblicazione, in cui sia esattamente descritto il metodo di immunizzazione seguito oggi nell'Istituto *Pasteur* per la produzione del siero antipestoso. Nella descrizione quindi delle modificazioni apportate ai metodi primitivi del *Roux* e del *Yersin* ricorreremo ai nostri ricordi personali e agli accenni di diversi autori.

I cavalli sono trattati per parecchi mesi con culture morte di peste, con tossine ricavate da culture in brodo e con culture viventi e virulente di bacillo pestoso, fino a quando non reagiscono più nè alle culture morte, nè alle culture vive, nè alle tossine.

In primo tempo s' inoculano nelle vene dei cavalli culture di peste su agar emulsionate in brodo e uccise per un ora a 65°. Quindi i cavalli sono trattati colle tossine. Queste tossine sono ricavate da culture in brodo sviluppate a 25°, e filtrate. Il filtrato, che contiene le tossine del bacillo pestoso, è inoculato sotto cute in dosi crescenti. Dopo che i cavalli hanno raggiunto un alto grado d' immunizzazione, sono ad essi inoculate nelle

vene le culture vive e virulente, avendo cura che l'emulsione da inoculare abbia la temperatura del corpo dell'animale e che prima dell' inoculazione sia passata a traverso uno strato di cotone per togliere i grossi accumuli.

In questo periodo, oltre l' inoculazione endovenosa di culture vive e virulente, i cavalli ricevono di tanto in tanto delle iniezioni sotto cute di discrete quantità di tossine pestose, di cui $^1/_{60}$ di cmc. è capace di uccidere un topo adulto.

L' intero trattamento, per ottenere un siero ben attivo, dura quasi 6 - 7 mesi. Nel 1901 si trovavano nell' Istituto sieroterapico di Parigi 38 cavalli immunizzati con questo procedimento, i quali ogni mese potevano fornire 4 - 5000 boccette di siero antipestoso della capacità di 20 cmc. l'una.

b) *Siero antipestoso di Berna.*

Il *Tavel*, *Krumbein e Glucksmann* (1) ci hanno dato una dettagliata descrizione del metodo seguito nell' Istituto vaccinogeno e sieroterapico svizzero di Berna per l' immunizzazione dei cavalli adibiti alla produzione del siero antipestoso.

Dopo avere assicurato il perfetto stato di salute dei cavalli (malleinizzazione, osservazione veterinaria), si comincia con inoculare in essi dosi sempre crescenti di culture morte di peste, preparate secondo il metoto di *Haffkine.* Si lasciano sviluppare i bacilli pestosi in brodo per un mese a 30°, si sterilizzano per un ora a 65° e vi si aggiunge il 0,5 % di acido fenico. Si comincia coll' inoculare di questo materiale 1 cmc : e quindi si passa all' inoculazione di 2, 4, 8, 16, cmc. raddoppiando sempre la dose, fino a quando i cavalli sopportano senza reazione alcuna, l' inoculazione di 200 cmc. Le inoculazioni in principio per le piccole quantità, si praticano sotto la cute : per le quantità più grosse, si praticano iniezioni intramuscolari nella regione delle spalle.

L' intervallo tra una inoculazione e l'altra varia secondo la gravità e la durata della reazione. Bisogna attenersi ad ogni

(1) *Tavel Krumbein u. Glücksmann.* - *l c.*

modo alla regola di praticare l'inoculazione quando ogni reazione è scomparsa ed il cavallo si è completamente ristabilito dagli affetti della inoculazione precedente.

Dopo questo primo periodo d' immunizzazione colle culture morte, si comincia l' inoculazione nelle vene di culture fresche di bacilli pestosi vivi e virulenti. Queste iniezioni devono essere fatte da un personale pratico ed intelligente dopo aver ridotto il cavallo in assoluta inazione.

Si comincia coll' inoculare nella giugulare 10 cmc. di cultura viva, quindi 25, 30, 50, 80, 100, 150 cmc. e così di seguito. Non è il caso di usare per ogni inoculazione successiva la dose doppia di quella adoperata precedentemente ; perchè non ostante il grado d' immunità raggiunto dal cavallo, si avrebbero delle reazioni troppo forti.

Le iniezioni endovenose nell 'Istituto di Berna si eseguiscono nel modo seguente : il cavallo viene rasato e disinfettato nella regione della giugulare e nella vena ben tesa mediante la pressione con un laccio intorno al collo, si caccia la cannula ben sterilizzata di un trequarti, a cui si adatta un oliva di deflusso con un tubo di gomma sterilizzato, che finisce all'estremità con un tubo di vetro di scolo.

Si lascia uscire un po' di sangue, indi se ne arresta il deflusso facendo pressione sul tubo di gomma, e al tubo di vetro s' innesta un imbuto sterilizzato. Si eleva questo imbuto all' altezza della testa del cavallo dopo aver tolto il laccio di pressione vi si versa la soluzione fisiologica di cloruro di sodio riscaldata a 37°. Quindi si aggiunge lentamente e con le dovute cautele la cultura di peste presa direttamente dal termostato e si lava l'imbuto ancora con soluzione fisiologica di cloruro di sodio.

Finita l'operazione tutto l'apparecchio d'inoculazione viene prestamente sterilizzato, cacciandolo in un recipiente con antisettici (sublimato e soluzione al 5 $^0/_0$ di lisolo).

Disinfettata e protetta la ferita, il cavallo viene sollecitamente trasportato in scuderia, perchè la reazione comincia ben presto.

L'intervallo da far seguire tra una inoculazione e l' altra varia secondo l'intensità e la durata di tale reazione. É necessario prima di ripetere l' altra inoculazione aspettare qualche tempo dopo che il cavallo sia completamente ristabilito.

Tra l'ultima inoculazione e la presa del sangue bisogna per lo meno lasciare passare 14 giorni. Nell'istituto di Berna il sangue si estrae generalmente 3 settimane dopo l'ultima inoculazione, seguendo il metodo comune del salasso dalla giugulare colle regole della più scrupolosa asepsi.

Prima di procedere alla raccolta del sangue è necessario assicurarsi con opportuno esame (culture, inoculazione nei ratti), che in esso non vi siano nè tossine, nè bacilli vivi della peste.

L' Istituto di Berna mette in vendita il suo siero con un metodo, speciale d'imbottigliamento, senza aggiunta di disinfettanti.

c) *Siero antipestoso Lustig.*

Questo siero fu ottenuto dal *Lustig*, immunizzando i cavalli mediante il suo vaccino, che, come abbiamo detto, fu ricavato dai corpi bacillari seguendo un procedimento chimico.

Ecco come il *Lustig* immunizzò nell'Istituto di Patologia generale di Firenze il primo cavallo col suo vaccino per ottenere un siero antipestoso.

Fu adoperato un vaccino preparato di fresco da culture virulentissime pei topi. Si cominciò con una inoculazione sottocutanea di 5 centigrammi di sostanza attiva sciolta in acqua alcalinizzata sterile.

Dopo 9 giorni si praticò una seconda inoculazione con 14 centigrammi di sostanza attiva.

Dopo 6 giorni, scomparsi i fenomeni di reazione, si fece una terza inoculazione con 16 centigrammi.

Dopo un'altra settimana si praticò una 4ª vaccinazione con 22 centigrammi.

Quindi in altre due volte furono inoculati ancora altri 40 centigrammi di sostanza attiva sempre sotto la cute della spalla.

Dopo i buoni risultati ottenuti nell'epidemia pestosa di Bombay

coll'uso del siero preparato dal *Lustig* a Firenze, il Governo inglese di accordo col Municipio di Bombay diede l' incarico al Dr. *Galeotti* di istituire in questa città un laboratorio municipale per la produzione del siero antipestoso. In questo modo il siero *Lustig* divenne *siero indiano.*

Esso fu ricavato dai cavalli immunizzati mediante le inoculazioni sottocutanee di dosi sempre crescenti di vaccino antipestoso preparato col metodo *Lustig-Galeotti.* La quantità di sostanza attiva adoperata oscillò per i singoli cavalli immunizzati entro limiti molto larghi. La dose di vaccino inoculata in una sola volta si elevò da 4 centigrammi a 1 grammo e mezzo.

Il Dr. *Alfonso Mayr*, che successe al *Galeotti* nella Direzione dell'Istituto, cercò di ottenere la sostanza attiva sempre dalla medesima cultura molto virulenta di peste e non da diverse culture. E ciò nell'intento di ottenere sempre un vaccino di attività costante. Per ottenere una cultura virulentissima del bacillo della peste, il *Mayr* usufruì del fatto dimostrato dal *Polverini*, che la virulenza del bacillo pestoso si eleva significantemente se esso si sviluppa nel polmone, producendo la pneumonite pestosa: e tenne alta la virulenza del bacillo da usare per la fabbricazione del vaccino, producendo nelle scimmie forme di peste pulmonare, mediante l' inoculazione di bacilli pestosi nella trachea.

Secondo il *Mayr*, il contenuto in peptone dei terreni nutritivi è anche importante per ottenere culture di forte virulenza. Egli inoltre ritiene che per la buona immunizzazione dei cavalli sono da preferirsi le inoculazioni di piccole dosi di vaccino sempre crescenti ripetute a brevi intervalli di tempo.

d) *Sulla preparazione di un siero antipestoso antitossico.*

Tutti i sieri antipestosi preparati nei diversi Istituti e usati per la cura e la profilassi dell'infezione pestosa sono dei sieri battericidi. Secondo il *Markl* è questa una grave lacuna nella preparazione del siero antipestoso, il quale, perchè sia efficace, secondo quest'autore, deve essere contemporaneamente battericida e antitossico. Di quì la necessità di studiare le tossine del ba-

cillo della peste e i tentativi da parte di diversi autori di preparare un siero antipestoso antitossico.

Per completare la storia della preparazione dei sieri antipestosi, accenneremo qui agli studi più importanti su questo argomento e allo stato attuale delle nostre conoscenze sulle tossine del bacillo pestoso.

Tutti gli autori sono concordi nel ritenere l'esistenza di un veleno pestoso specifico; ma per molti autori la sostanza velenosa è contenuta nei corpi bacillari come componente integrale della cellula batterica, non come prodotto di ricambio che passi nel terreno di cultura: per altri invece nel bacillo pestoso esiste un veleno segregato dalle cellule batteriche e sciolto nelle culture liquide.

Yersin, Calmette e Borrel per i primi dimostrarono colle loro ricerche come il veleno pestoso sia un componente della stessa cellula batterica e che nei filtrati di culture in brodo liberi di germi non esiste nessun veleno sciolto. La stessa opinione espresse la *Commissione tedesca, Albrecht e Ghon, Lustig* e molti altri. Ed anche il *Wernicke*, quantunque si mostri favorevole all'esistenza di un veleno pestoso solubile, pure nei filtrati di giovani culture in brodo non trovò mai un veleno specifico sciolto.

Tutti questi autori dimostrarono invece che le culture di bacilli pestosi su agar costituite solo dai corpi dei bacilli, sono molto velenose.

I bacilli della peste quindi secondo questi autori si comportano riguardo al veleno, come le culture di tifo e di colera.

Il *Wernicke* intanto, come anche l' *Albrecht e Gohn* poterono dimostrare nelle vecchie culture di peste in brodo una notevole azione tossica dei filtrati liberi di germi.

In opposizione alle idee predominanti e comunemente accettate sul veleno del bacillo pestoso, il *Markl* sostenne l'opinione che il bacillo della peste fosse capace di segregare una tossina solubile nei mezzi liquidi di cultura.

Questa tossina solubile del bacillo pestoso compare, secondo il *Markl* già dopo 24 ore nelle culture in brodo ed è molto

sensibile all' azione del calore. La temperatura di 25° c. basta a distruggerla in gran parte.

Quindi per ottenere queste tossine si appropriano meglio le culture tenute a bassa temperatura, al massimo a quella dell'ambiente e in flacconi con grande superficie. Più vecchie sono le culture, più cresce la quantità di sostanze tossiche contenute nei filtrati. Il maximum si raggiunge dopo 2 mesi di sviluppo. Dopo quest'epoca, la produzione di tossina decresce.

Secondo il *Markl* i filtrati delle culture in brodo di bacillo pestoso, non contengono un'unica sostanza velenosa, ma una miscela di diverse sostanze tossiche.

Fu appunto con queste sostanze tossiche, ricavate dai filtrati di vecchie culture in brodo di bacilli pestosi, che il *Markl* cercò di riempire la lacuna esistente nella preparazione del siero antipestoso. Egli afferma infatti di aver immunizzato un cavallo con queste tossine e di aver ottenuto un siero antipestoso antitossico.

Anche il *Kossel* (1), nel X Congresso internazionale d'Igiene e Demografia del 1900 a Parigi, comunicò, che in alcune ricerche istituite coll' *Overbeck*, avevano potuto immunizzare dei ratti verso l'infezione con bacilli virulenti di peste mediante l'inoculazione di filtrati di culture in brodo di peste riscaldate per 1 ora a 60°.

Stando la questione in questi termini, parve opportuno al *Kolle* (2) di istituire su questo argomento delle ricerche su largo materiale.

In queste esperienze adoperò il *Kolle* un' intera serie di diverse culture di bacilli pestosi, isolate in parte dall'uomo in parte dai ratti.

Le culture si fecero sviluppare in brodo alcalino neutralizzato con aggiunta di 0.5 gr. di soda cristallizzata per ogni litro di brodo. Si ottenne lo sviluppo di queste culture a 37°, a 30°, a 22°, a 6°-10°.

(1) *Kossel und Overbeck.* — Ref. Hyg. Rundschau 1901.

(2) *W. Kolle.* — Studien über das Pestgift — Festschrift zum sechzigsten Geburtstage von. R. Koch. Iena. Fischer 1903.

I bacilli pestosi furono uccisi o con l'aggiunta di acido fenico o con l'aggiunta di toluolo. Fu evitata l'azione del calore per l'uccissione dei bacilli, perchè, secondo gli autori, le alte temperature, eserciterebbero un' azione nociva sulle tossine del bacillo della peste.

Dalle culture in brodo, dopo l' uccissione dei germi, furono allontanati i corpi bacillari mediante la centrifugazione: il liquido soprastante completamente chiaro fu pipettato. Il *Kolle* sperimentò anche col liquido ottenuto mediante la filtrazione delle culture in brodo attraverso la candela di *Chamberland*, senza previa uccisione dei microrganismi.

I liquidi ottenuti, sia mediante la centrifugazione, sia mediante la filtrazione attraverso la candela di *Chamberland*, furono provati per la sterilità; e dopo avere con ogni sicurezza assodata in essi l'assenza di germi, furono inoculati nei ratti. L' inoculazione fu sempre praticata nel peritoneo.

Coi filtrati delle giovani culture in brodo non è mai riuscito al *Kolle* di produrre la morte dei ratti, anche inoculando nel peritoneo 3 cmc. di liquido. Nemmeno colle dosi di 5 cmc. fu potuta notare azione tossica. Al contrario una notevote tossicità mostrarono le stesse culture se insieme ai filtrati s' inocularono anche i corpi bacillari. Da questi esperimenti risulta che nelle giovani culture in brodo di bacilli pestosi le sostanze velenose sono legate alle cellule batteriche.

Nella prova delle culture di peste in brodo dell'età di 7-10 giorni comparirono delle differenze nella tossicità dei filtrati, secondo che le colture furono lasciate sviluppare a 37° o a bassa temperatura. Mentre i filtrati di culture sviluppate a bassa temperatura non mostrarono nessuna tossicità, quelli di culture sviluppate a 37° manifestarono invece un' azione tossica: a dosi di 1,5 cmc, 2 cmc questi filtrati, inoculati nel peritoneo, uccisero i ratti.

Quanto più vecchie diventarono le culture, tanto maggiore fu la tossicità dei filtrati. Ma il *Kolle* fece un' importante osservazione. Egli notò, che, coll'aumentare della tossicità del filtrato, si modificò l'azione del veleno in essi contenuti. Si ac-

corciò notevolmente il periodo di incubazione: già dopo 10-15 minuti comparvero gravi sintomi e dopo 1-2 ore l'animale morì.

Socondo il *Kolle* questi effetti tossici non sono prodotti dal veleno pestoso primitivo. Molto probabilmente si tratta quì di corpi non specifici, che compaiono nelle vecchie culture sviluppatesi per lungo tempo e che in quelle di tifo, colera e piocianeo, furono indicate sotto il nome di *cadaverine, putrescine.* Secondo il *Kolle* non vi è dubbio alcuno che la comparsa di tossine solubili nelle vecchie culture dipende dalla macerazione e dalla morte dei bacilli pestosi. Le ricerche microscopiche ne danno una prova: poichè nelle vecchie culture si trovano solamente detriti di bacilli e solo rare cellule batteriche ben conservate e tingibili.

I bacilli della peste si comportano quindi sotto questo riguardo come il bacillo del tifo e del colera. Nei filtrati delle giovani culture in brodo non è dimostrabile nessun veleno; ma coll' invecchiare delle culture, compaiono in esse gli enzimi peptici, le *autolisine*, le sostanze velenose legate ai corpi bacillari, che col distuggersi di questi, diventano libere nel liquido nutritivo.

Il *Kolle* stabilì delle ricerche d' immunizzazione coi filtrati di giovani culture di peste in brodo. Egli inoculò a 4 cavalli fino a 200 cmc. di filtrati di culture di bacillo pestoso in brodo di 6-8 giorni. Il siero di sangue di questi cavalli, anche dopo un trattamento di parecchi mesi, non mostrò nessuna azione curativa e protettiva.

In una seconda serie di esperienze immunizzò il *Kolle* i cavalli con filtrati di culture in brodo di bacilli pestosi lasciate sviluppare per 8-10 settimane. In parecchi mesi la dose salì da 10 cmc, a 200 cmc. Il siero di sangue di questi cavalli si mostrò di poco più attivo di quello normale.

Il Kolle inoltre potè constatare, che nè i sieri antipestosi di Parigi e di Berna, nè il siero dei cavalli trattati con grosse dosi di filtrati di vecchie culture in brodo di bacilli pestosi, mostrarono azione neutralizzante sulle sostanze tossiche contenute nei filtrati delle vecchie culture di peste in brodo.

Il *Kolle* quindi nelle sue ricerche non ha potuto confermare il fatto notato dal *Markl*, che nel siero dei cavalli trattati coi filtrati di vecchie culture vi sia un' antitossina per i veleni in essi contenuti.

I tentativi quindi degli autori di ottenere un siero antipestoso antitossico finora hanno avuto un risultato completamente negativo. Nè il *Kolle*, nè *l'Uschinski*, nè il *Wernicke* poterono produrre un siero capace di neutralizzare le tossine del bacillo pestoso.

Il solo *Markl* afferma di averlo ottenuto ; ma il *Markl* nel provare l'azione di questo siero non uscì dai limiti in cui anche il siero normale di cavallo esercita su detti veleni la medesima azione.

È questo quindi un campo ancora aperto agli studi e alle ricerche, quantunque non sieno grandi le speranze di riuscire nell'intento : se si tiene conto delle nostre conoscenze sulla natura del veleno del bacillo pestoso e dei risultati ottenuti con microrganismi come il tifo e il colera, che hanno grande analogia col bacillo della peste perciò che riguarda la loro tossicità.

III. Dosaggio dei sieri antipestosi.

Non è il caso che ci fermiamo quì a ricordare tutte le modalità seguite nella produzione del siero antipestoso, esse sono identiche a quelle della preparazione del siero antidifterico.

Un solo argomento merita qui di essere discusso ed è il dosaggio del siero antipestoso.

Prima di ogni altra cosa ricorderemo i metodi seguiti nei diversi Istituti produttori da noi menzionati.

a) *Istituto Pasteur di Parigi.*

Il dosaggio ha per iscopo di stabilire il potere curativo e il potere protettivo del siero. Riproduciamo qui testualmente il metodo di dosaggio adoperato nell' Istituto *Pasteur* di Parigi.

1) Prova del potere curativo.

Una cultura di peste su agar di 24 ore è diluita in 1 cmc.

di brodo. S' intinge in questa diluzione un fine ago di siringa *Pravaz* e con questo ago intriso di emulsione pestosa si punge la zampa di un topo bianco. Gli animali inoculati in questo modo muoiono in 36-44 ore.

Sedici ore dopo l' inoculazione eseguita in questo modo si inietta ai topi bianchi $^1/_{10}$, $^1/_4$, $^1/_2$, centimetro cubico di siero antipestoso.

Le diluzioni di siero fatte in soluzione fisiologica di cloruro di sodio vengono inoculate riportandole quanto più è possibile alla quantità di un centimetro cubico.

L' iniezione del siero si pratica sotto la pelle del dorso.

Ogni saggio si ripete su parecchi topi bianchi.

2) Prova del potere protettivo.

Per dosare il potere protettivo del siero antipestoso nell' istituto *Pasteur* di Parigi si usa lo stesso metodo d' infezione e lo stesso animale (topi bianchi).

S' inocula $^1/_{50}$, $^1/_{20}$, $^1/_{10}$. di centimetro cubico di siero sotto la cute del dorso dei topi bianchi: e dopo 24 ore s'iniettano pungendoli alla zampa con un ago di siringa *Pravaz* intriso nell'emulsione di una cultura di bacilli pestosi su agar in 1 cmc. di brodo.

b) *Istituto di Berna.*

Nell' Istituto di Berna invece il dosaggio del siero antipestoso si fa sui ratti. Si comincia collo stabilire la dose minima mortale di una cultura di bacilli pestosi in brodo mediante una serie di prove sui ratti.

Con questa dose minima mortale s' infetta un certo numero di ratti sotto cute nella regione dell' inguine: e contemporaneamente s' inietta ad essi sotto la cute del dorso una determinata quantità di siero in rapporto col peso dell'animale.

Si dirà che il valore del siero è di 1 : 120, se 1 cmc. di siero sarà sufficiente per salvare un ratto del peso di 120 grammi.

c) *Siero Lustig.*

Il *Lustig* provò il suo siero sui topi e sui ratti. Il siero fu inoculato nella quantità di un cmc. nel peritoneo degli animali, che contemporaneamente o 4 ore prima furono infettati me-

diante l' iniezione nel peritoneo di un'ansa di platino di una cultura virulenta di peste su agar di 48 ore emulsionata in 1 cmc. di acqua.

A questo breve accenno dei metodi di dosaggio dei sieri antipestosi adoperati in diversi istituti produttori, non possiamo astenerci, data l' importanza dell' argomento, di far seguire alcune osservazioni.

I fattori, che hanno grande influenza sui risultati della prova del siero antipestoso sono rappresentati;

1) dalla virulenza e dalla quantità di materiale infettante inoculato negli animali;

2) dalla specie dell'animale adoperato in questa prova;

3) dalla quantità di siero specifico inoculato.

Per ciò che riguarda il materiale infettante, riteniamo condizione indispensabile, che, nel dosaggio del siero antipestoso, esso sia rappresentato da una quantità ben nota e costante nella sua azione infettante.

Non possiamo quindi accettare il metodo d' infezione adoperato nell' Istituto *Pasteur* di Parigi. Il *Behiring e Römer* [1] infatti hanno dimostrato in una serie di esperienze, che infettando i topi colla puntura alla zampa con un ago fine di siringa *Pravaz* intriso nell'emulsione di una cultura di peste su agar in 1 cmc. di brodo, non si viene a usare sempre la medesima quantità di materiale infettante. Una serie di topi inoculati in questo modo non morirono dopo lo stesso tempo, ma mostrarono grandi differenze.

Nè possiamo trovare giustificato il metodo di prendere come materiale infettante un ansa di platino o una frazione di essa di una cultura di peste su agar, senza alcun riguardo alla virulenza di detta cultura.

Noi crediamo indispensabile nel dosaggio del siero antipestoso d' infettare gli animali con una cultura di bacillo pestoso, di cui si è stabilita con ogni approssimazione la dose minima mortale per l'animale su cui si pratica il dosaggio. E nello

(1) *Von Behring und Römer*. - 1 c.

scegliere la quantità di questa cultura da inoculare, bisogna assolutamente attenersi alla dose minima mortale o ad una dose di poco superiore.

E noto infatti, come l'*Ehrlich* ed il *Wassermann* [1] in una serie di esperienze poterono dimostrare il fatto d'indole generale, che se una data quantità di siero basta per salvare l'animale dall'infezione prodotta da una determinata dose di materiale infettante, un multiplo della quantità di siero è insufficiente a salvare l'animale dall'infezione prodotta dallo stesso multiplo di materiale infettante.

Da questa legge generale risulta che un siero antipestoso, anche se è dotato di un forte potere, resterà inattivo, se per l'infezione dell'animale si adoperò un grosso multiplo della dose minima mortale.

Noi quindi crediamo che il metodo migliore da seguire nel dosare e nel provare l'efficacia del siero antipestoso sia quello proposto dall'Istituto di Berna: infettare cioè gli animali colla dose minima mortale di una data cultura di peste.

Un altra questione di grande importanza per il dosaggio del siero antipestoso è la scelta dell'animale su cui praticare detto dosaggio.

È fatto comunemente riconosciuto da tutti gli autori, che il siero antipestoso, come i vaccini antipestosi, non manifesta la stessa azione in tutte le specie di animali. In seguito ritorneremo su questo argomento e non mancheremo di rilevare le cause, che, secondo le nostre moderne conoscenze sull'immunità passiva, possono spiegarci il diverso modo di comportarsi del siero antipestoso nelle diverse specie di animali. Qui notiamo solo il fatto.

Anche per riguardo all'animale adoperato non crediamo prudente seguire il metodo di dosaggio del siero antipestoso usato nell'Istituto *Pasteur* di Parigi. In questo Istituto la prova del siero si fa sui topi bianchi. Il topo non è l'animale più adatto per sperimentare l'azione del siero antipestoso. Dalle esperienze

(1) *Ehrlich und Wassermann.* - Gesammelte Arbeiten zur Immunitätsforschung herausgegeben von Prof. - Ehrlich Berlin. 1904.

di *Kolle, Martini e Pfeiffer* risulta infatti che il topo dà nella prova del siero antipestoso risultati poco soddisfacenti e incostanti. Il *Pfeiffer* afferma, che avendo fatto alcune esperienze sui topi, sulle cavie e sui ratti, potè convincersi che solamente questi ultimi sono adatti per dimostrare l'azione del siero antipestoso.

Il *v. Behring e Römer* provarono l'azione del siero antipestoso di Parigi solo sui topi ed ebbero risultati meno soddisfacenti degli altri autori.

A togliere tutte le differenze, spesso abbastanza rilevanti, che nella prova del siero antipestoso, vengono date dalle diverse specie di animali da esperimento, noi crediamo indispensabile provare l'efficacia del siero sempre e in tutti i casi sulla medesima specie di animali. E ciò anche per avere una certa uniformità di apprezzamenti.

In quanto alla specie di animali da scegliere, è naturale che debba essere preferita quella che meglio si presta per mettere in evidenza l'azione specifica del siero.

Per il siero antipestoso l'animale più adatto a questo scopo, per opinione concorde di tutti gli autori che si sono occupati di questo argomento, è il ratto.

Noi quindi crediamo che al metodo usato nel Laboratorio *Pasteur* di Parigi sia, anche sotto questo punto di vista, da preferirsi il metodo di dosaggio adoperato nell'Istituto di Berna, in cui la prova del siero è fatta sui ratti.

Ad ogni modo il valore di un siero antipestoso, dato il modo diverso di comportarsi delle diverse specie di animali verso la immunità passiva da esso conferito, è sempre relativo a quell'animale su cui fu praticato l'esperimento.

Ora perchè il dosaggio metta in evidenza solo le differenze dipendenti dalla qualità del siero adoperato è necessario eliminare tutte le altre cause che possono, indipendentemente dal siero, influire sui risultati dell'esperimento: e sopratutto riteniamo opportuno:

1) usare sempre la stessa quantità di materiale infettante (dose minima mortale di una determinata cultura di bacilli pestosi),

2) adoperare sempre la stessa specie di animali (ratto);

3) ricorrere sempre allo stesso metodo d' inoculazione tanto del siero, quanto del materiale infettante.

Solo in questo modo potremo ottenere un'uniformità di giudizio indispensabile per formarci un criterio esatto del siero antipestoso messo in commercio dai diversi istituti.

IV. Nostre esperienze.

In queste nostre esperienze ci siamo occupati solamente del potere protettivo del siero antipestoso.

Abbiamo adoperato nelle nostre ricerche quasi esclusivamente il siero dell' Istituto *Pasteur* di Parigi, che il Direttore del servizio sieroterapico di quell'Istituto ha gentilmente messo a nostra disposizione.

Abbiamo richiesto all' Istituto vaccinogeno e sieroterapico svizzero di Berna il siero antipestoso ivi preparato; ma per un accidente occorso ai cavalli immunizzati, non si trovò in grado di fornirci il siero richiesto. Abbiamo potuto disporre solo di una piccola quantità di siero Berna che già avevamo presso di noi da più di sei mesi.

Ci siamo anche rivolti al *Lustig*, per ottenere il suo siero; ma l' egregio Professore ci rispose che dal 1899 egli non prepara più il siero antipestoso a Firenze e che quindi non era in grado di soddisfare il nostro desiderio.

Siamo dolenti di non aver potuto seguire il consiglio del prof. *Lustig* di prepararci da noi stessi detto siero immunizzando delle grosse cavie col vaccino *Lusitg - Galeotti*, che noi abbiamo preparato in discreta quantità. Abbiamo già dichiarato in principio di questo lavoro, che, costretti ad eseguire queste nostre ricerche nel Laboratorio di Pianosa, abbiamo potuto solo disporre di un tempo limitato, che non ci ha permesso di istituire delle immunizzazioni complete delle cavie col vaccino *Lustig*.

Ci auguriamo con successive ricerche di poter tornare ancora sulla importante questione del siero antipestoso: e allora non tralasceremo certo di occuparci anche dell'azione del siero prodotto col metodo *Lustig*.

In queste nostre prime ricerche, noi abbiamo voluto solo pren-

dere in esame le questioni d' indole generale, colla certezza che una volta risolute queste, si possa passare allo studio delle questioni particolari inerenti all' uso e alla preparazione del siero antipestoso.

Avremmo voluto anche sperimentare con siero antipestoso prodotto da noi. A tale scopo cominciammo coll' immunizzare una capra ed un asino.

La capra fu trattata con vaccino antipestoso preparato secondo il metodo seguito nel Laboratorio di Pianosa: e ci spingemmo ad inoculare nelle vene fino a 350 cmc. di vaccino.

L'asino invece fu immunizzato con vaccino antipestoso preparato secondo il metodo della commissione tedesca. Anche in questo asino inoculammo grosse dosi nelle vene.

Provati questi sieri sui ratti si mostrarono poco attivi. Oramai è fatto assodato, che, per ottenere un siero antipestoso efficace è indispensabile inoculare direttamente nelle vene degli animali, dopo il trattamento con culture morte, culture viventi e virulentissime di bacillo pestoso.

I pericoli inerenti a queste pratiche sono tali e tanti, che non è prudente eseguirle senza avere a propria disposizione un personale ben educato e delle stalle ben isolate e costruite in modo da potere essere sempre e facilmente disinfettate.

Ciò è tanto più necessario in quanto che inoculando bacilli pestosi viventi nel torrente circolatorio dell'animale, essi restano per qualche tempo viventi eliminandosi, secondo il *Wladimiroff* (1) cogli escreti e coi secreti dell' animale stesso.

Ed è tanto vera questa circostanza, che in tutti gl' Istituti ove si produce il siero antipestoso con questo metodo (*Pasteur* di Parigi e Berna), prima di procedere al salasso per la raccolta del siero, si fanno delle ricerche intese a dimostrare l'assenza di bacilli pestosi nel sangue circolante del cavallo (culture e inoculazioni nei ratti).

Mossi da queste considerazioni, la cui gravità non ha bisogno

(1) *Wladimiroff.* - Kritischer Ueberblick über die spezifischen Mittel, die für die Bekämpfung der Bubonenpest in Vorschlag gebracht sind - Ref. Centr. f. Bakt. Bd. XXIV. 1898.

di altre dimostrazioni, abbiamo rinunziato alla ulteriore immunizzazione della capra e dell'asino. E ci siamo quindi limitati a sperimentare col siero di Parigi.

Le dosi di siero da noi adoperate furono varie: e siccome abbiamo sperimentato solo sul potere protettivo del siero, esso è stato sempre inoculato o contemporaneamente o prima dell'infezione.

Come animali da esperimento ci siamo serviti dei ratti e delle cavie.

Per la dose di materiale infettante abbiamo seguito gli stessi criteri usati nelle ricerche sulle vaccinazioni. Abbiamo stabilito di una data cultura la dose minima mortale e ci siamo serviti per infettare gli animali del decuplo di essa per garentirci dai possibili errori di tecnica.

Contemporaneamente agli animali trattati col siero antipestoso, furono inoculati colla stessa dose di materiale infettante dei controlli a cui si iniettò anche la stessa quantità di siero normale di cavallo.

In tutti gli animali morti la diagnosi fu assodata coll'esame microscopico e in molti casi con ricerche culturali.

Riportiamo i risultati di queste nostre esperienze nelle annesse tabelle.

TABELLA N. 16.

Sieroprofilassi.

(Infezione contemporanea al trattamento col siero).

Numero d'ordine	Dose di siero inoculata	Infezione	Esito
1 Cavia	c. c. 1	$\frac{1}{1000}$ di ansa	Muore 25 - 3 - 04
2 »	»	»	» 30 - 3 - 04
3 »	c. c. 1,5	»	» 24 - 3 - 04
4 »	»	»	» 26 - 3 - 04
5 »	c. c. 2	»	» 24 - 3 - 04
6 »	»	»	Vive
7 »		»	Muore 19 - 3 - 04
(Controllo)			
8 »		»	» »
9 »		»	» »

TABELLA N. 17.

Sieroprofilassi.

(*Infezione 6 ore dopo il trattamento col siero*).

Numero d'ordine		Dose di siero inoculata	Infezione	Esito
1	Cavia	c. c. 1	$\frac{1}{1000}$ di ansa	Muore 24 - 3 - 04
2	»	»	»	» 27 - 3 - 04
3	»	c. c. 1,5	»	» 26 - 3 - 04
4	»	»	»	» 27 - 3 - 04
5	»	c. c. 2	»	» »
6	»	»	»	Vive
7	»		»	Muore 19 - 3 - 04
(Controllo)				
8	»		»	» »
9	»		»	» »

TABELLA N. 18.

Sieroprofilassi.

(Infezioni 12 ore dopo il trattamento col siero).

Numero d'ordine		Dose di siero inoculata	Infezione	Esito
1	Cavia	c. c. 1	$\frac{1}{1000}$ di ansa	Muore 24 - 3 - 04
2	»	»	»	» 25 - 3 - 04
3	»	c c 1,5	»	» 25 - 3 - 04
4	»	»	»	Vive
5	»	c. c. 2	»	Muore 28 - 3 - 04
6	»	»	»	Vive
7	»		»	Muore 20 - 3 - 04
	(Controllo)			
8	»		»	» »
9	»		»	» »

TABELLA N. 19.

Sieroprofilassi.

(Infezione 24 ore dopo il trattamento col siero).

Numero d'ordine	Dose di siero inoculata	Infezione	Esito
1 Cavia	c. c. 1	$\frac{1}{1000}$ di ansa	Muore 27 - 3 - 04
2 »	»	»	» 30 - 3 - 04
3 »	c. c. 1,5	»	» 24 - 3 - 04
4 »	»	»	» 30 - 3 - 04
5 »	c. c. 2	»	» 25 - 3 - 04
6 »	»	»	Vive
7 »		»	Muore 20 - 3 - 04
(Controllo)			
8 »		»	» »
9 »		»	» »

TABELLA N. 20.

Sieroprofilassi.

(Infezione contemporanea al trattamento col siero).

Numero d' ordine		Dose di siero inoculata	Infezione	Esito
1	Ratto	c. c. 1,5	$\frac{1}{1000}$ di ansa	Muore 25 - 3 - 04
2	»	»	»	Vive
3	»	»	»	»
4	»	»	»	»
5	»	c. c. 2	»	Muore 30 - 4 - 04
6	»	»	»	» »
7	»	»	»	» 19 - 4 - 04
8	»		»	» 21 - 3 - 04
(Controllo)				
9	»		»	» »
10	»		»	» »

TABELLA N. 21.

Sieroprofilassi.

(Infezione 6 ore dopo il trattamento col siero).

Numero d'ordine		Dose di vaccino inoculata	Infezione	Esito	
1	Ratto	c. c. 1,5	$\frac{1}{1000}$ di ansa	Muore	22 - 3 - 04
2	»	»	»	»	»
3	»	»	»	»	30 - 3 - 04
4	»	»	»	»	»
5	»	c. c. 2	»	Vive	
6	»	»	»	»	
7	»	»	»	»	
8	»		»	Muore	22 - 3 - 04
	(Controllo)				
9	»		»	»	»
10	»		»	»	»

TABELLA N. 22.

Sieroprofilassi.

(*Infezioni 12 ore dopo il trattamento col siero*).

Numero d'ordine		Dose di vaccino inoculata	Infezione	Esito
1	Ratto	c. c. 1,5	$\frac{1}{1000}$ di ansa	Muore 28 - 4 - 04
2	»	»	»	» »
3	»	»	»	Vive
4	»	»	»	»
5	»	c. c. 2	»	»
6	»	»	»	»
7	»	»	»	»
8	»		»	Muore 24 - 3 - 04
	(Controllo			
9	»		»	» »
10	»		»	» »

TABELLA N. 23.

Sieroprofilassi.

(Infezione 24 ore dopo il trattamento col siero).

Numero d'ordine	Dose di siero inoculata	Infezione	Esito
1 Ratto	c. c. 1,5	$\frac{1}{1000}$ di ansa	Muore 28 - 3 - 04
2 »	»	»	» »
3 »	»	»	Vive
4 »	»	»	»
5 »	c c. 2	»	»
6 »	»	»	»
7 »	»	»	»
8 »		»	Muore 24 - 3 - 04
(Controllo)			
9 »		»	» »
10 »		»	» »

Riferiamo qui sommariamente i risultati ottenuti:

a) *Cavie* - Ventiquattro cavie furono trattate col siero antipestoso (1 cmc. 1, 5. 2 cmc.) e infettate sotto cute con $^1/_{1000}$ di ansa di cultura virulenta di peste di 24 ore su agar. Di queste 24 cavie: 6 furono inoculate col siero contemporaneamente all'infezione: 6 sei ore prima: 6 dodici ore prima: 6 ventiquattr'ore prima. Di queste 24 cavie se ne salvarono cinque. Di 12 cavie invece di controllo, tutte morirono infallantemente dopo quattro o cinque giorni, mostrando nel sangue e negli organi abbondanti bacilli pestosi. Mentre queste cavie fin dal secondo giorno si mostravano ammalate, con pelo arruffato, tristi e mangiavano poco: quelle invece inoculate col siero, erano vispe e mangiavano con avidità, formando un contrasto molto notevole. Mentre nelle cavie di controllo si formò nel luogo d'inoculazione un edema diffuso senza limiti ben netti, nelle cavie invece inoculate con siero antipestoso nel luogo d'inoculazione si formò un bubboncino nettamente circoscritto. Spaccati queste tumefazioni fuorusciva della sostanza purulenta, in cui l'esame microscopico metteva in evidenza numerosi bacilli della peste.

Abbiamo voluto richiamare l'attenzione su questo fatto, che noi abbiamo costantemente osservato nelle cavie trattate preventivamente col siero, perchè esso ci sembra molto importante per provare l'aumentata resistenza dell'animale all'invasione del germe infettivo.

Mentre negli animali di controllo a noi riuscì sempre e in tutti i casi di mettere in evidenza nel sangue e negli organi interni numerosi bacilli pestosi: in parecchie di queste cavie trattate col siero e morte dopo quattordici o quindici giorni dell'avvenuta infezione la dimostrazione del bacillo pestoso nel sangue o riuscì difficile o non riuscì affatto.

Nelle nostre ricerche l'azione protettiva del siero antipestoso nelle cavie si manifestò in modo evidente o salvandole dall'infezione o ritardandone l'esito fatale.

b) *Ratti* - Furono trattati con siero antipestoso di Parigi 28 ratti. La dose di siero adoperato fu di 1, 5 - 2 cmc.: di questi 28 ratti sette furono inoculati di siero contemporaneamente al-

l'infezione: sette, sei ore prima: sette, dodici ore prima e sette, ventiquattr' ore prima.

Di questi 28 ratti se ne salvarono 16: gli altri morirono d'infezione pestosa, ma sopravissero fino a 8 giorni ai 12 controlli, che morirono infallantemente dopo 4-5 giorni dall'avvenuta infezione.

Da queste esperienze sui ratti l'azione protettiva del siero antipestoso è dimostrata ancora in modo più evidente.

Anche nei ratti abbiamo osservato, come l'edema prodotto dall'inoculazione sottocutanea dei bacilli pestosi abbia una spiccata tendenza a restare circoscritto e nettamente limitato dai tessuti circostanti sotto forma di bubbone.

V. Uso e limiti del siero antipestoso.

Colle nostre esperienze abbiamo dimostrato, che il siero antipestoso di Parigi ha una notevole azione protettiva per i ratti e per le cavie. Esso eleva evidentemente la resistenza di questi animali verso una dose sicuramente mortale di bacilli pestosi. E se non tutti gli animali furono salvati dalla morte, a tutti fu prolungata notevolmente la vita in paragone ai controlli.

Il siero antipestoso, come tutti i sieri specifici, non conferisce agli animali un'immunità di lunga durata, come l'immunizzazione attiva prodotta dalle vaccinazioni. Esso al contrario conferisce l'immunità rapidamente. Non solo inoculato contemporaneamente al materiale infettante, ma anche dopo qualche tempo - nel periodo d'incubazione può salvare l'animale dall'infezione.

Ora se si tien conto, che molte volte in un'epidemia pestosa, il sanitario si trova innanzi a un gruppo di persone che si suppone per i loro rapporti cogli ammalati siano già infettati, si giudicherà facilmente quale prezioso mezzo di profilassi si può trovare nell'uso del siero antipestoso.

Ed è appunto in questi casi, come abbiamo già detto, che l'uso delle vaccinazioni, anche se non aggrava il decorso della malattia, riesce del tutto inutile.

All'uso del siero antipestoso nell'uomo, sono state mosse alcune obbiezioni, che noi discuteremo nei loro punti principali.

La prima di queste obbiezioni si riferisce alla possibilità di applicare all'uomo il siero per proteggerlo dall'infezione pestosa.

Dalle nostre esperienze e da quelle di tutti gli autori sull'azione del siero antipestoso, risulta che non tutti gli animali si comportano verso di esso nello stesso modo.

La Commissione tedesca infatti assodò che mentre bastavano 3-5 cmc. di siero per proteggere sicuramente i macachi dall'infezione prodotta da 1 ansa di cultura di peste virulenta su agar inoculata sotto cute: 10 cmc. di siero invece non mostravano nessuna azione inoculati nelle scimmie grigie. Questi risultati devono, secondo la Commissione tedesca, suggerirci delle precauzioni nell'applicazione del siero antipestoso nell' uomo.

Il *Kolle*, il *Martini*, il *Pfeiffer*, il *Tavel* ,il *Polverini* e altri autori notano il fatto, che il siero antipestoso in alcuni animali esercita la sua azione in altri no.

Secondo il *Martini* la sua azione sarebbe negativa nei topi e nei gatti: positiva nei ratti, nelle cavie e nei conigli. Secondo il *Pfeiffer* invece delle tre specie di animali: la cavia, il topo e il ratto, solo quest'ultimo è adatto per mettere in evidenza l' azione specifica del siero antipestoso.

E senza entrare qui in maggiori particolarità e senza ricordare osservazioni già menzionate nell'accenno bibliografico delle ricerche eseguite su questo argomento; diremo che tutti gli autori sono concordi nel ritenere, che il siero antipestoso esercita sulle varie specie di animali una diversa azione.

Anche noi abbiamo potuto stabilire nelle nostre ricerche notevoli differenze tra le cavie e i ratti: infatti mentre su 24 cavie trattate col siero se ne salvarono appena 5 (20 %), su 28 ratti se ne salvarono invece 16 (58. 12 %).

Di questo dato sperimentale alcuni autori si sono serviti per sollevare il dubbio, che il siero antipestoso efficace per alcuni animali, possa restare senza azione alcuna inoculato nell'uomo. Colla stessa forza di ragionamento il *Polverini* emette l'opinione, che il siero antipestoso il quale dà risultati negativi in molte specie di animali, possa invece mostrarsi efficacissimo se è inoculato nell' uomo.

Per risolvere questo problema dovrebbe stabilirsi un' esperimento diretto sull'uomo. Ma certo non sono sufficienti in questo senso le statistiche delle inoculazioni a scopo preventivo di siero antipestoso fatte in diverse epidemie. Trattandosi di dimostrare l'azione protettiva del siero antipestoso e ricorrendo alle inoculazioni preventive in individui sani, si resta sempre in dubbio se i buoni risultati ottenuti sieno da attribuirsi all'azione del siero o alla mancata infezione.

Se il siero antipestoso possa essere applicato con fortuna all'uomo, come mezzo profilattico in un'epidemia di peste: è un problema che può solo essere risoluto per analogia e per induzione.

Certo non è possibile applicare all'uomo senz'altro i risultati ottenuti dagli esperimenti sugli animali: come i risultati ottenuti nei ratti non possono integralmente applicarsi alle cavie. Ma il principio resta immutato. E una volta dimostrato che il siero antipestoso è dotato di potere specifico ed è capace di proteggere gli animali da esperimento (cavie, ratti, conigli, topi, macachi ecc. ecc.) dall'infezione pestosa: nessuna ragione, nè nessun dato di fatto giustifica il mettere in dubbio che tale azione protettiva non sia spiegata anche sull' uomo.

Anzi, restando sempre nel campo delle induzioni, molti dati di fatto concorrono a farci ritenere che l'uomo rappresenta un terreno favorevole, perchè il siero antipestoso possa esercitare la sua azione specifica.

Parrebbe infatti, che meno un animale è suscettivo verso la peste, più evidente è l'azione protettiva del siero su di esso.

In una serie di esperimenti istituiti sui conigli, abbiamo potuto constatare che questi animali, che effettivamente sono meno suscettivi verso l'infezione pestosa dei ratti e delle cavie, acquistarono dopo l'inoculazione di 2 cmc. di siero una completa immunità verso l' infezione prodotta con una dose di bacilli pestosi sicuramente mortale.

Noi abbiamo già accenato al fatto, che l'uomo non è verso la peste più suscettibile del ratto e della cavia. Nella maggioranza dei casi il bacillo pestoso resta nell' uomo per un tempo più o meno lungo circoscritto nelle glandole linfatiche (bub-

bone) e pare che generalmente solo poco tempo prima della morte si diffonda nel sangue ed invada tutti gli organi interni. E noto inoltre come molte volte l'uomo guarisce dall'infezione pestosa e che molte epidemie assumono un carattere benigno.

Questi fatti concorrono a farci ritenere che già naturalmente l'uomo oppône una notevole resistenza all'invasione del bacillo pestoso nel suo organismo. Il siero antipestoso, elevando ancora di più questa naturale resistenza, dovrebbe appunto nell'uomo manifestare la sua azione specifica, sia impedendo che l'infezione si sviluppi, sia aiutando l'organismo a riuscirne vittorioso nei casi in cui essa si manifesti.

Ed a questa ancora un' altra considerazione bisogna aggiungere a favore dell' uso del siero antipestoso nell' uomo. Noi abbiamo potuto dimostrare, come l'azione del siero antipestoso sia in ragione inversa della quantità di materiale adoperato per produrre l'infezione. E ciò è anche in dipendenza della legge generale stabilita dall' *Ehrlich* e dal *Wassermann*, che inoculando 2-3 volte la dose mortale di un bacillo, gli animali muoiono anche se si inocula 2-3 volte la quantià di siero specifico capace di salvarli dalla dose minima mortale.

Ora è bene qui ricordare quello che abbiamo detto altrove: vale a dire, che il materiale col quale l'uomo resta infettato nell'infezione naturale di peste, è rappresentato regolarmente da quantità scarse, non di molto superiore alla dose minima mortale, e qualche volta non dotato di grande virulenza.

Una grave obbiezione è stata fatta per ciò che riguarda l'uso del siero antipestoso nell'uomo, ed è quella della quantità necessaria di siero da inocularsi per ottenere l'azione protettiva.

In generale gli autori si riferiscono alla quantità di siero antipestoso necessaria per salvare un grammo di topo e, applicando la stessa proporzione all'uomo, arrivano a cifre enormi.

Il *Martini* (1) per esempio, dopo aver notato che la dose per salvare un animale da esperimento col siero antipestoso è rappresentata almeno da $^1/_{60}$ del peso dell'animale, per un uomo

(1) *Martini*. - Ueber die Wirkung des Pestserums bei experim. Pneumonie etc. Klin Iahrb. Bd. X Hef 2.

del peso medio di 60 Kilogrammi, dovrebbe usarsi per lo meno la dose di 1000 cmc. di siero antipestoso. Secondo il *Marx* (1) questa dose per un uomo di 60 Kilogrammi dovrebbe essere niente di meno che di litri 9 e mezzo!

Ed anche il *Pfeiffer* (2) dubita dei risultati ottenuti dagli autori francesi, che con 10 cmc. di siero antipestoso si possa conferire all'uomo un'immunità che duri più di 4 settimane.

Va da sè che se ciò fosse vero e se la quantità di siero da inocularsi all'uomo dovesse essere stabilita con questi criteri, il siero antipestoso non potrebbe avere nessuna pratica applicazione nell'uomo, non essendo possibile ricorrere a dosi così enormi.

L'argomento quindi è di tale e tanta importanza, che noi abbiamo creduto opportuno istituire delle ricerche per vedere se la relazione tra il peso dell'animale da immunizzare e la quantità di siero da impiegarsi sia oppur no una legge costante e dimostrata esatta dall'esperimento.

Dalle nostre ricerche sui ratti risulta che per salvare un ratto del peso di 130 grammi è necessario usare per lo meno 1 cmc. e mezzo di siero antipestoso di Parigi.

Se la proporzione dovesse restare la stessa per tutti gli animali, per salvare un coniglio di 4300 grammi dovrebbe usarsi almeno una dose di siero di 40 cmc: oppure secondo il calcolo del *Martini* di circa 66 cmc.

Come si vedrà dall'annessa tabella, noi abbiamo inoculato 4 conigli del peso di 4 Kilogrammi con 2-4 cmc. di siero antipestoso di Parigi e contemporaneamente li abbiamo infettati con $^1/_{100}$ di ansa della nostra cultura di peste. Due conigli dello stesso peso furono infettati per controllo colla stessa dose di bacillo pestoso e inoculati contemporaneamente con 2-4 cmc. di siero normale di cavallo.

I due conigli di controllo morirono di setticemia pestosa al 6° giorno; morì anche un coniglio inoculato con 4 cmc. di siero. Gli altri 3 conigli sopravvissero.

(1) *Marx E.* - Diagnostica sperimentale, sieroterapia e profilassi delle malattie infettive. Trad. italiana Bertarelli. - Torino 1902.

(2) *Pfeiffer.* - l. c.

TABELLA N. 24.

Sieroprofilassi.

(Infezione contemporanea al trattamento col siero).

Numero d'ordine	Dose di siero inoculata	Infezione 1 - 5 - 04	Esito
1 Coniglio	c. c. 2	$\frac{1}{100}$ di ansa	Vive
3 »	» »	»	»
4 »	» 4	»	Muore 15 - 5 - 04
2 »	» »	»	Vive
5 »		»	Muore 7 - 5 - 04
(Controllo)			
6 »		»	» »

Da questo esperimento risulta che indipendentemente dal peso dell'animale, per salvare un coniglio di 4 Kilogrammi basta quasi la stessa quantità di siero necessaria per salvare un ratto di 130 grammi.

Noi quindi siamo dell'opinione, che i calcoli basati solamente sulla legge di proporzione tra la quantità di siero antipestoso e il peso dell'animale sieno destituiti di ogni fondamento sperimentale. Nè lo stabilire la dose necessaria di siero per conferire l'immunità all' uomo, applicando senz' altro tale proporzione assodata nel topo, o nel ratto, o in altro animale, è giustificato dalla teoria sul modo d'azione dei sieri battericidi.

Modo d'azione dei sieri battericidi.

Qui crediamo opportuno di fare uua breve digressione, per ricordare le idee principali sull'azione dei sieri battericidi.

Dopo che il *Fodor* (1), il *Nuttal* (2), il *Nissen* (3), il *v. Behring* (4), e il *Buchner* (5), stabilirono colle loro ricerche che il siero di sangue degli animali spesso esercita un'azione battericida sugli agenti infettivi, il *V. Behring* e il *Nissen* (6)

(1) *Fodor* J. v. - Ueber die Alkalinität des Blutes u. Infektion. Centr. f. Bakt. Bd. 17. 1895.

— Neuere Untersuchungen über die bakterientötende Wirkung des Blutes u. über Immunisation Centr. f. Bakt. Bd. 7. 1890 - Deutsche med. Woch. 1887.

(2) *Nuttal.* - Experimente über die bakterienfeindlichen Einflüsse des sierischen Körpers. Zeits. f. Hyg. Bd. 4. 1888.

(3) *Nissen.* - Zur Kenntniss der bakterienvernichtenden Eigenschaften des Blutes. - Zeits. f. Hyg. Bd. 6. 1889.

(4) *V. Behring.* - Ueber die Ursache der Immunität von Ratten gegen Milzbrand. - Centr. f. klin. med, 1888.

— Beiträge zur Aetiologie des Milzbrandes. - Z. f. Hyg. Bd. 6. 1889.

(5) *Buchner.* - Ueber bakterientötende Wirkung des zellenfreien Blutserums. - Centr. f, Bakt. Bd. 5. 1889

— e Bd. 6 Nro. 1.

— Untersuchungen über die bakterienfeindlichen Wirkungen des Blutes und des Blutserums. Arch. f. Hyg. 1890. Bd. 10,

— Weitere Untersuchungen über die bakterienfeindlichen und globuliciden Wirkungen des Blutserums. Arch. f, Hyg Bd. 17 1893.

(6) *v. Behring u. Nissen.* — Ueber bakterienfeindliche Eigenschaften verschiedener Serumarten. Zeitsch. f. Hyg. Bd, 8 1890 e Bd, 9.

dimostrarono che tale potere battericida non solo si può constatare più evidente negli animali naturalmente immuni, ma anche in quelli artificialmente immunizzati. Essi infatti trovarono che il siero di sangue delle cavie immunizzate verso il vibrione di *Metchnikoff*, si mostrava fortemente battericida per tale vibrione, mentre il siero di sangue delle cavie normali non manifestava nessuna azione.

Ad ogni modo fu presto notato che in molti casi, anche in animali fortemente immunizzati verso un dato microrganismo, nel sangue non compariva nessuna sostanza battericida.

Queste contradizioni furono più tardi eliminate e spiegate, quando specialmente per opera di v. *Behring* fu intrapreso lo studio della immunità antitossica.

Dopo che il *Roux e Yersin* (1) ebbero trovato il veleno della difterite: e il *Brieger e Fränkel* (2), il *Knud Faber* (3) e il *Kitasato* (4) ebbero trovato e studiato il veleno del tetano, fece il *v. Behring* (5) insieme al *Kitasato* l'importante scoverta, che il siero di sangue degli animali immunizzati con detti veleni (tossine) mostrava la proprietà di neutralizzare i veleni stessi.

Si ebbero così dei sieri battericidi, capaci di uccidere i microrganismi e dei sieri antitossici capaci di neutralizzare le tossine.

Il siero antipestoso finora preparato entra nella categoria dei sieri battericidi. Noi quindi ci occuperemo solamente del modo di azione di questi.

(1) *Roux et Yersin.* - Contribution à l'étude de la diphtérie (I e II). Ann. Pasteur 1888 e 1889.

(2) *Brieger u. Fränkel.* - Untersuchungen über Bakteriengifte. Berliner Klin. Wochenschrift 1890.

(3) *Knud-Faber.* - Die Pathogenese des Tetanus. - Berlin. Klin. Wochens. 1890.

(4) *Kitasato.* - Experimentelle Untersuchungen über das Tetanus gift. - Z. f Hyg. Bd. 10. 1891.

(5) *V. Behring. u. Kitasato.* - Ueber das Zustandekommen der Diphtherieimmunität und der Tetanusimmunität bei Tieren. - D. med, Woch. 1890.

Il *Metchnikoff* (1) ed altri osservarono il fatto che molti sieri battericidi spiegavano verso gli agenti infettivi un'azione specifica protettiva allorchè erano inoculati negli animali e ciò non ostante non manifestavano su detti germi nessuna azione battericida in vitro.

Il *Pfeiffer* (2) studiò l'azione del siero battericida sul vibrione del colera. In una cavia immunizzata contro questo vibrione portò nella cavità addominale germi colerigeni virulenti e constatò che essi perdevano la loro motilità e si trasformavano in piccoli granuli dissolvendosi. Portati invece questi vibrioni nell'addome di una cavia non immunizzata, restavano mobilissimi, inalterati e si accrescevano producendo la morte dell'animale. Lo stesso processo di distruzione si manifestò anche se i vibrioni del colera erano stati inoculati nell' addome di una cavia normale insieme a siero di sangue di animale immunizzato verso gli stessi microrganismi. Questo fenomeno che comunemente va sotto il nome di *fenomeno di Pfeiffer*, si compì senza la partecipazione dei leucociti e sì mostrò specifico.

Al di fuori del corpo dell'animale, in vitro, trovò il *Pfeiffer*, che il siero ottenuto dal sangue degli animali immunizzati contro il vibrione del colera, era quasi completamente inattivo verso questo microrganismo. Egli ritenne perciò che, la sostanza battericida fosse contenuta nel siero in una forma stabile inattiva e che nell'organismo dell'animale fosse trasformata in una sostanza attiva labile.

Il *Metchnikoff* (3) mostrò in seguito che il siero anticoleroso spiega la sua azione battericida anche al di fuori dell'organismo, in vitro, se ad esso si aggiunge dell'essudato peritoneale fresco di cavia normale, contenente dei leucociti.

(1) *Metchnikoff*. - Recherches sur le choléra. Ann. de l'Ist. Pasteur 1893 - 1894.

(2) *Pfeiffer*. - In Flügge s Mikroorganismen. - Die Spirillen .1896. *Pfeiffer u. Wassermann*. - Untersuchungen über das Wesen der Choleraimmunität. - Z. f. Hyg. Bd. 14 1893.

(3) *Metschnikoff*. - l. c.

Il *Bordet* [1] completò questa osservazione mediante la dimostrazione che l'azione in vitro si esercita sempre, se il siero specifico è usato appena estratto dal corpo dell'animale o se si mescola ad esso del siero normale fresco.

In base a questi fatti, il *Bordet* emise la sua teoria che l'azione fortemente battericida di un siero immunizzante si deve a l'azione di due sostanze: una di queste è l'*alessina* di *Buchner*, che si trova abitualmente nel sangue normale, l'altra si forma mediante l'immunizzazione: essa è per sè sola inattiva, ma l'alessina non specifica le conferisce un forte potere battericida specifico.

Il *Bordet* chiamò *sostanza battericida* l'alessina di *Buchner* che si trova nel sangue normale ed è molto labile; e *sostanza preventiva* quella che si trova solamente nel siero specifico degli animali immunizzati.

A completare le sue idee sui sieri battericidi, il *Bordet* [2] si servì dei fatti osservati in un altro campo di studio: lo studio dei sieri emolitici.

I reperti ottenuti da *Bordet* sulla produzione artificiale di un siero emolitico mediante l' iniezione di sangne di una specie di animale in un animale di un altra specie, furono confermate da *Ehrlich* e *Morgenroth* [3] i quali in una serie di lavori studiarono il modo di formazione e di azione delle sostanze emolitiche.

Per l' *emolisi* come per la *batteriolisi* sono necessarie, secondo l'*Ehrlich* due sostanze: una sostanza che agisce specifi-

(1) *Bordet.* - Mode d'action des sérums préventifs - Ann. Inst. Past. 1895. Les leucocytes et les propriétés actives du sérum chez les vaccines. - Ann. Past. 1895.

(2) A - Sur l'agglutination et la dissolution des globules rouges par le sérum d'animaux injectés de sang défibrîné. - Ann. d. Inst. Past. 1898 - Les sérums hémolytiques leurs antitoxines et les théories des sérums cytolytiques. - Ann. de l'Inst. Pasteur 1900, 1901.

(3) *Ehrlich und Morgenroth.* - Zur Theorie der Lysinwirkung. I. Ueber Hämolysine. II. Berl. Klin. Woch. 1899.

— Ueber Hämolysine III u IV. - Berlin. Klin. Woch. 1900

— Ueber Hämolysine V u VI. - Berlin. Klin Woch. 1901.

Ehrlich. — Gesammelte Arbeiten zur Immunitätsforzchung. - Berlin. 1901.

camente, resistente, stabile, che l'*Ehrlich* chiamò « *corpo immunizzante* » « *corpo intermedio* » e corrispondente alla « *sostanza preventiva* « di *Bordet*, alla « *filocitasi* » di *Metchnikoff*, alla « *copula* » di *Nuller*, al « *Desmon* » di *London* al « *preparatore* » di *Gruber*, alla « *sostanza sensibilizzatrice* degli autori francesi ; e una sostanza fortemente labile, che si trova nel sangue normale, l'alessina di *Buchner*, che l'*Ehrlich* e *Morgenroth* chiamarono « *conplemento* » o « *addimento* » e che corrisponde alla « *sostanza batterida* » di Bordet alla « *citasi* » degli autori francesi.

Secondo l'*Ehrlich* il corpo immunizzante dei sieri battericidi si formerebbe nello stesso modo come l'antitossina dei sieri antitossici.

Per la dissoluzione dei corpuscoli rossi o dei batteri inoculati nell'animale diventano liberi dei complessi atomici, che si uniscono a determinate catene laterali del protoplasma cellulare.

Le catene laterali rigenerate in eccedenza e spinte nel sangue rappresentano il corpo immunizzante. Esse possiedono la capacità di legarsi coi complessi atomici delle emazie o dei batteri, che contribuirono alla loro formazione (teoria delle catene laterali).

Secondo l'*Ehrlich* quindi il corpo immuuizzante deve possedere un gruppo aptoforo specifico, che lo lega ai corpuscoli rossi o ai batteri con cui l'animale fu trattato.

Il complemento invece esiste già preformato nel sangue normale e non ha la facoltà di legarsi direttamente ai corpuscoli rossi o ai batteri : ma solamente acquista questa facoltà quando esso è unito al corpo immunizzante.

In modo che, secondo la dottrina di *Ehrlich* (1), il corpo immunizzante possiede due diversi complessi aptofori : uno che ha una grande affinità col corrispondente gruppo aptoforo delle emazie e dei batteri : e un secondo gruppo di scarsa energia chimica, che è in condizione di unirsi più o meno completamente all'addimento che esiste normalmente nel siero di sangue.

Per questa sua funzione il corpo immunizzante fu anche

(1) *Ehrlich* - l. c. Die Seitenkettentheorie und ihre Gegner Ver. f. inn. Med.Berlin 1901

chiamato dall'*Ehrlich* e dai suoi discepoli « *corpo intermedio* » o con nome più comprensivo « *recettore* ».

In seguito l'*Ehrlich* e il *Sachs* (1) dimostrarono la molteplicità dei complementi esistenti nel sangue normale. Essi stabilirono i seguenti fatti:

1) ogni siero normale contiene una serie di diversi complementi;

2) in diversi animali si trovano in parte alcuni complementi identici, che sono completamente simili od almeno nei loro gruppi aptofori.

Questi fatti hanno una grande importanza per darci la ragione, per la quale un siero battericida inoculato in un animale il cui siero ha quel dato complemento, può spiegare una forte azione battericida e può invece restare inefficace se è inoculato in una specie di animale il cui siero è sprovvisto del complemento che abbia affinità col corpo immunizzante specifico del siero inoculato.

Intanto un nuovo fatto e della maggiore importanza, veniva scoverto dal *Neisser e Wechsberg* (2) e chiamato « *fenomeno paradosso* ».

Il *Pfeiffer* (3), il *Löffler e l' Abel* (4) avevano già notato nei loro esperimenti, che i sieri specifici battericidi esercitavano la loro azione protettiva inoculati in dosi medie; ma restavano inefficaci se erano adoperati in grosse quantità.

Il *Neisser e Wechsberg* in una serie di ricerche in vitro, stabilirono il seguente fatto molto interessante. Un siero immunizzante specifico reso inattivo mediante il riscaldamento a 60°

(1) *Ehrlich u. Sachs.* - Uber die Vielheit der Komplemente des Serums. - Berlin. Klin. Woch. 1902.

Ehrlich u. Marshall. - Ueber die complementophilen Gruppen der Amboceptoren. - Berlin. Klin. Woch. 1902.

(2) *Neisser und Wechsberg.* — Ueber die Wirkungsart baktericider Sera Munch. med. Woch 1901.

Lipstein. — Die Complementablenkung bei baktericiden Reagenzglasversuchen und ihre Ursache. Centr. f. Bakt. Originale. Bd. 31. 1902.

(3) *Pfeiffer.* — l. c. Weitere Untersuchungen über das Wesen der Choleraimmunität und über specifisch baktericide Prozesse. Z. f. Hyg. Bd. 18. 1894.

(4) *Löffler und Abel.* — Ueber die specifischen Eigenschaften der Schutzkörper im Blute typhus-und coliimmuner Tiere. Centr. f. Bakt. Bd. 19. 1896.

e riattivato sempre colla stessa quantità di siero normale fresco (complemento), mostrò in vitro un forte potere battericida usato in una data dose: ma usando quantità maggiori di siero specifico, la azione battericida da esso spiegata diminuiva sempre col crescere della dose fino a scomparire del tutto.

Il fatto, che nel processo d' immunizzazione coi sieri battericidi solo il corpo immunizzante inattivo è fornito in eccesso, mentre il complemento non subisce nessuno aumento, ci dà la ragione, per cui un siero battericida, non ostante il suo grande contenuto in corpi immunizzanti può essere poco attivo per l'animale.

E nello stesso tempo è chiarita la circostanza, per cui un siero battericida non spiega nell'animale una azione relativa alla quantità di siero inoculata; ma solo in limiti ristretti finchè l' infezione non abbia sorpassata una data misura.

In quanto all'origine e alla sede del complemento gli autori sono tutt'altro che concordi.

Metchnikoff (1), *Gengou* (2), *Levaditi* (2), *Denys* (4) e altri ritennero che il plasma del sangue fosse libero di complemento e colle loro esperienze dimostrarono, che esso si forma per la distruzione dei leucociti e si versa nel torrente circolatorio.

L' *Ehlirch* (5), tutti i suoi discepoli, il *Moxter* (6) e altri negarono ogni rapporto tra i leucociti e il complemento, che si troverebbe normalmente nel plasma sanguigno.

Il *Buchner* (7) invece e i suoi discepoli *Hahn* (8), *Trom-*

(1) *Metchnikoff.* — L' immunité dans les maladies infectieuses. Paris 1901.

(2) *Gengou.* — Contribution à l'étude de l'origine de l'alexine des sérums normaux. Ann. Inst. Pasteur T. 15 1901.

(3) *Levaditi.* — Etat de la cytase dans le plasma. Ann. Inst. Pasteur. T. 15 1902.

— Contribution à l'étude de l'anémie expérimentelle sur l'état de la cytase hémolytique dans le plasma des animaux normaux. Ann. Inst. Pasteur. 1901.

(4) *Denys et Kaisin.* — Le pouvoir bactéricide du sang-La cellule T. 9. 1893.

(5) *Ehrlich* — l. c.

(6) *Moxter.* — Die Beziehungen der Leucocyten zu den bakterienauflösenden Substanzen der thierischen Säfte. D. med. Woch. 1899.

(7) *Buchner.* — Zur kenntniss der Alexine sowie der specifisch baktericiden und specifisch hämolytischen Wirkungen. Munch. med. Woch. 1900.

(8) *Hahn.* — Ueber die Beziehung der Leukocyten zur baktericiden Wirkung des Blutes. Arch. f. Hyg. Bd. 25 1895.

msdorf [1] e altri, ammisero tale rapporto tra i leucociti e il complemento, ma non nel senso del *Metchnikoff*: essi ritennero il complemento un prodotto di secrezione dei leucociti, che si trova libero nel plasma sanguigno normale. Il *V. Dungern* [2] e il *Gruber* [3] sono dell'opinione che il complemento si trovi libero nel sangue normale circolante.

Anche sull'origine del corpo immunizzante non sono concordi le teorie emesse dai vari autori nelle diverse epoche. Le dottrine che ai tempi nostri maggiormente si contendono il dominio sono la dottrina leucocitaria del *Metchnikoff*, e la dottrina delle catene laterali di *Ehrlich*.

Queste stesse teorie sono state anche applicate al meccanismo dell' immunità del siero antipestoso. E così mentre il *Denys e Tartakowsky* [4], il *Besredka* [5], *Markl* [6] e altri ritennero come unico fattore dell'immunità la fagocitosi, il *Kolle* e *Martini* [7] attribuirono l'attività del siero antipestoso, alla batteriolisi prodotta da sostanze battericide specifiche in esso contenute. Senza entrare qui in maggiori dettagli, che esorbiterebbero dall' indole di questo nostro lavoro, noi vogliamo qui far notare solamente, che tutti gli autori sono concordi nel ritenere, che l'azione di un siero battericida, e quindi del siero antipestoso, è legata all'esistenza di due sostanze : il corpo immunizzante che viene portato col siero specifico e il complemento che si trova nel sangue dell'animale, in cui è inoculato il siero.

Risulta che il concetto dell' immunità passiva, per ciò che riguarda i sieri battericidi, non deve essere preso nello stesso

(1) *Trommsdorff.* — Können von lebenden Leukociten Alexine secerniert werden? Arch. f. Hyg. Bd. 40.

(2) *V. Dungern.* — Globulicide Wirkungen des sierischen Organismus. Münch. med. Woch. 1899-1900.

(3) *Gruber.* — Ueber Bakteriolyse und Hämolyse. Munch. med. Woch. 1901.

(4) *Denys et Tartakowsky.* — Precédé d'inoculation augmentant l'action du sérum antipesteux. Bull. d. l'acad. royale de méd. de Belgique. Tom. XIV n. 6.

(5) *Besredka.* — De l'immunisation active contre la peste ecc. ecc. Ann. Inst. Pasteur 1902. T. XII.

(6) *Markl.* — Zur Kenntniss des Mechanismus der künstlichen Immunität gegen Pest. Z. f. Hyg.Bd. 42 1903.

(7) *Kolle und Martini.* — Ueber Pest-D. med. Woch. 1902

significato della parola. L'animale non subisce passivamente l'azione del siero: ma contribuisce col complemento del suo sangue a rendere attivi i corpi immunizzanti in esso inoculati già preformati e in eccesso col siero specifico.

Applicazioni di queste teorie all' uso del siero antipestoso nell'uomo.

Siccome i complementi contenuti nel sangue normale sono molteplici: e non tutti hanno la stessa affinità per un dato corpo immunizzante, nè tutti si trovano in ogni specie di animale, così la teoria convalida il fatto dimostrato dall'esperimento, che non tutti gli animali si comportano nello stesso modo verso l'azione protettiva del siero antipestoso.

Esso quindi può restare inefficace, inoculato anche in forti dosi, in un piccolo animale, il cui sangue manca del complemento adatto, e spiegare invece una notevolo azione in un grosso animale, anche inoculato in piccoli dosi, se nel sangue di questo animale, è contenuto il complemento che ha grande affinità per il recettore del siero antipestoso.

Nè basta. In base al fenomeno paradosso dimostrato dal *Neisser* e *Wechsberg*, l'azione del siero antipestoso non è in diretta proporzione della quantità di siero inoculato. Il *Tavel* e i suoi colloboratori han potuto vedere nelle loro esperienze col siero di Berna, che restarono in vita i ratti in cui fu inoculato il siero antipestoso, nella proporzione di 1 : 20, 1 : 50; e morirono quelli in cui esso fu inoculato nella proporzione di 1 : 10.

Anche noi abbiamo potuto osservare nel corso delle nostre ricerche, che, elevando la dose del siero a 5-6 cmc., i risultati ottenuti erano meno favorevoli di quelli che si ottenevano usando la dose di 2 cmc.

Non è il caso che noi ci fermiamo qui a spiegare questo fatto, che a prima vista potrebbe sembrare strano e inverosomile.

Noi vogliamo solamente insistere ancora una volta sul fatto, che nè i dati dell'esperimento, nè la dottrina sul modo di azione del siero antipestoso parlano a favore dell' idea, che esista un

rapporto matematico tra il peso dell' animale e la quantità di siero da inoculare per proteggerlo dall' infezione pestosa, nel senso che questo rapporto assodato per una specie di animali possa senz' altro essere applicata come regola generale, a tutte le altre.

L'azione del siero antipestoso per l' uomo, indipendentemente dal peso, sarà più o meno efficace, secondo che i gruppi di complemento, contenuti nel suo sangue, hanno una maggiore o minore affinità col receptore del siero antipestoso specifico in esso inoculato.

Per portare quindi un contributo sperimentale sulla importante questione, se il siero antipestoso trovi, inoculato nell' uomo, le condizioni favorevoli per spiegare la sua attività, anche se è inoculato in dosi non eccessive, bisogna ricorrere ad un'altra serie di ricerche che noi ci auguriamo di poter intraprendere, appena ci sarà permesso di ritornare su questo argomento.

Queste ricerche dovrebbero essere intese a dimostrare, se nel plasma sanguigno dell' uomo esista oppur no, il complemento adatto per il corpo immunizzante specifico del siero antipestoso.

Per ora noi ci limitiamo a dichiarare arbitrarie e non corrispondenti alla realtà le conclusioni del *Martini*, del *Marx* e di tutti quegli autori che ritengono indispensabile l' uso di grosse quantità di siero antipestoso per ottenere buoni risultati nell' uomo.

Dati i risultati delle esperienze istituite col siero antipestoso sugli animali e tenuto conto che nessun fatto esiste in contrario, noi dobbiamo ritenere che il siero antipestoso possa e debba essere adoperato con fortuna nell' uomo, per proteggerlo dall' infezione pestosa.

E nello stesso tempo noi riteniamo, che all' uso del siero antipestoso debbono essere messi quei limiti, che suggerisce la qualità dell' immunità da esso conferita.

Il siero antipestoso infatti conferisce un' immunità che si manifesta rapidamente: ma che dura un tempo relativamente breve. Già dopo 7-8 giorni comincia a diminuire, per scomparire del tutto dopo un paio di settimane.

L'immunità passiva quindi conferita dal siero antipestoso ha qualità opposte all' immunità attiva conferita dalle vaccinazioni. Per conseguenza il siero antipestoso non può sostituire le vaccinazioni nella profilassi della peste.

Le vaccinazioni e la sieroprofilassi contro la peste non si escludono a vicenda, come vogliono alcuni autori; ma si completano. Esse secondo i diversi casi debbono essere usati l' una accanto alle altre. Pur restando le vaccinazioni come il mezzo più efficace per produrre un' immunità di lunga durata e completa, il siero antipestoso può rendere ottimi servigi tutte le volte che occorre conferire una pronta immunità.

Ed è questo il caso delle persone che allo scoppiare dell'epidemia pestosa senza oltre indugiare debbono venire a contatto cogli ammalati di peste e colle località infette.

L' uso del siero è indicato in tutte quelle persone o gruppi di persone, che si suppone sieno state infettate di peste al momento di cominciare il trattamento. Il siero spiegherà su di esse la sua azione, o impedendo lo sviluppo dell' infezione o rendendone più benigno il decorso nel caso si manifesti.

Se la pronta immunità conferita dal siero antipestoso può e deve essere sfruttata in un'epidemia, resta d'altronde ben fisso il concetto che il trattamento col siero ha solo effetti temporanei e che per ottenere un' immunità di lunga durata bisogna ricorrere alle vaccinazioni antipestose.

PARTE TERZA

SIERO-VACCINAZIONI

I. Storia.

In base alle esperienze, da noi già menzionate, sulla maggiore suscettività verso l'infezione pestosa, che gli animali acquistano se vengono vaccinati nel periodo d'incubazione della malattia, il *Calmette e Salimbeni* (1) proposero di ricorrere alla siero-vaccinazione, per ottenere nello stesso individuo la rapida immunità conferita dal siero e quella più duratura conferita dai vaccini antipestosi.

A tale scopo essi mescolarono alle culture uccise col calore e destinate ad essere impiegate come vaccino una piccola quantità di siero antipestoso. Nelle scimmie si veniva così ad evitare ogni reazione febbrile ed era diminuita la reazione locale. Secondo gli autori la immunità passiva conferita in tal modo dal siero era sufficiente per evitare i danni delle vaccinazioni sopra un'infezione pestosa in incubazione.

Nell'epidemia di peste bubbonica in Kobe e Osaka nel Giappone nel 1899-900 da *Kitasato, Takaki, Sigha e Moriya* (2) fu adoperato a scopo protettivo il metodo delle siero-vaccinazioni. Ecco in breve il processo seguito dagli autori. Il vaccino antipestoso fu preparato in modo che una dose era eguale a un'ansa di cultura su agar. Una prima inoculazione

(1) *Calmette e Salimbeni*. - l. c.

(2) Relazione sull'epidemia di peste in Kobe e Osaka dal novembre 1899 al gennaio 1900 Tokio, Sezione di Sanità del ministro dell' Interno (Giapponese) 1900.

fu praticata con parti eguali di siero antipestoso e vaccino nella quantità di 0.6-1 cmc.

Dopo pochi giorni fu praticata una seconda inoculazione con 0.6-1 cmc. di vaccino solamente. Su 47 persone trattate in questo modo nessuna ammalò.

Anche nella peste bubbonica di Napoli nel 1901 (1) fu praticata con buoni risultati la siero vaccinazione in 194 persone. Fu in primo tempo inoculato il siero *Yersin* e dopo qualche tempo il vaccino di Pianosa.

Il *Beinarowitsch* (2) ebbe buoni risultati sperimentali inoculando nei topi il siero antipestoso preparato da *Wladimiroff* a Pietroburgo ed infettandoli 12 ore dopo con 3 anse di platino di una cultura di peste viva virulenta.

Nella Conferenza sulla Peste tenuta a Berlino nel 1899 il *Pfeiffer* (3) dopo aver notato che l'immunità attiva non compare se non dopo 7-8 giorni, dichiarò che il siero antipestoso, capace di conferire l'immunità in 24 ore, ha un grande interesse pratico. Egli propose di ricorrere eventualmente nella profilassi dell'infezione pestosa alle siero-vaccinazioni, inoculando insieme culture uccise al calore e siero antipestoso.

Anche il *Besredka* (4) è fautore delle siero-vaccinazioni nella profilassi della peste; ma egli crede che vadano usate con una certa cautela. Egli infatti negli animali trattati col siero e col vaccino antipestoso, vide manifestarsi l'immunità, ma questa era di più breve durata in paragone di quella conferita dal solo uso del vaccino.

Da questo fatto arguisce il *Besredka* che il siero danneggi l'azione del vaccino. Nella pratica delle siero-vaccinazioni credette quindi quest'autore indispensabile di usare i corpi batterici mescolati colla quantità minima di siero. Per ottenere questo scopo egli preparò il suo vaccino, precipitando i corpi batterici coll'aggiunta di siero antipestoso nel modo da noi già descritto a pagina 31.

(1) Relazione già citata.
(2) *Beinarowitsch.* - l. c.
(3) *Pfeiffer.* - l. c.
(4) *Besredka.* - l. c.

Il *Besredka* assicura che con questo vaccino conferì ai topi una completa immunità, che si manifestò dopo 48 ore e durò per 5 mesi e mezzo.

Il *Martini*, invece di usare il siero e il vaccino inoculandoli contemporaneamente, consigliò di usare in primo tempo il siero e dopo 4-5 giorni il vaccino antipestoso.

Mancano ad ogni modo delle esaurienti ricerche sperimentali sull'azione delle siero-vaccinazioni, che potrebbero senza alcun dubbio acquistare una grandissima importanza pratica e meritano quindi tutta l'attenzione degli studiosi di tali questioni.

A noi rincresce che stretti dalle necessità del tempo, non abbiamo potuto sottomettere a ricerche sperimentali tutte le questioni inerenti alle siero-vaccinazioni. Ci siamo limitati solo ad affrontare la questione nelle sue linee generali.

II. Nostre esperienze.

Riferiamo nelle annesse tabelle i risultati di questi nostri esperimenti sulle cavie e sui ratti, e ne diamo quì un breve sommario.

TABELLA N. 25.

Sierovaccinazione.

(Infezione contemporanea alla sierovaccinazione).

N. d'ordine	Dose di siero inoculata	Dose di vaccino inoculata	Infezione 1 - 5 - 04	Esito
1 Cavia	c. c. 2	c. c. 4	$\frac{1}{1000}$ di ansa	Muore 9 - 5 - 04
2 »	»	»	»	» 10 - 5 - 04
3 »	»	»	»	» »
4 »	»	»	»	» 11 - 5 - 04
5 »	»	»	»	Vive
6 »				Muore 6 - 5 - 04
(Controllo)				
7 »				» »
8 »				» »

TABELLA N. 26.

Sierovaccinazione.

(Infezione contemporanea alla sierovaccinazione).

N. d'ordine	Dose di siero inoculata	Dose di vaccino inoculata	Infezione 1 - 5 - 04	Esito
1 Ratto	c, c. 2	c. c. 4	$\frac{1}{1000}$ di ansa	Muore 12 - 5 - 04
2 »	»	»	»	» 15 - 5 - 04
3 »	»	»	»	Vive
4 »	»	»	»	»
5 »	»	»	»	»
6 »				Muore 6 - 5 - 04
(Controllo)				
7 »				» »
8 »				» »

TABELLA N. 27.

Sierovaccinazione.

(Infezione 24 ore dopo la sierovaccinazione).

N. d'ordine	Dose di siero inoculata	Dose di vaccino inoculata	Infezione 1 - 5 - 04	Esito
1 Cavia	c. c. 2	c. c. 4	$\frac{1}{1000}$ di ansa	Muore 10 - 5 - 04
2 »	»	»	»	» 11 - 5 - 04
3 »	»	»	»	» »
4 »	»	»	»	» 13 - 5 - 04
5 »	»	»	»	Vive
6 »			»	Muore 6 - 5 - 04
(Controllo)				
7 »			»	» »
8 »			»	» »

TABELLA N. 28.

Sierovaccinazione.

(Infezione 24 ore dopo la sierovaccinazione).

N. d'ordine	Dose di siero inoculata	Dose di vaccino inoculata	Infezione 1 - 5 - 04	Esito
1 Ratto	c. c. 2	c. c. 4	$\frac{1}{1000}$ di ansa	Muore 8 - 5 - 04
2 »	»	»	»	» 12 - 5 - 04
3 »	»	»	»	Vive
4 »	»	»	»	» 18 - 5 - 04
5 »	»	»	»	Vive
6 »	»	»	»	»
7 » (Controllo)			»	Muore 6 - 5 - 04
8 »			»	» »
9 »			»	» »

TABELLA N. 29.

Sierovaccinazione.

(Infezione 48 ore dopo la sierovaccinazione).

N. d'ordine	Dose di siero inoculata	Dose di vaccino inoculata	Infezione 2 - 5 - 04	Esito
1 Cavia	c. c 2	c. c. 4	$\frac{1}{1000}$ di ansa	Muore 11 - 5 - 04
2 »	»	»	»	» 12 - 5 - 04
3 »	»	»	»	» »
4 »	»	»	»	» »
5 »	»	»	»	Vive
6 »			»	Muore 7 - 5 - 04
(Controllo)				
7 »			»	» »
8 »			»	» »

TABELLA N. 30.

Sierovaccinazione.

(Infezione 48 ore dopo la sierovaccinazione).

N. d'ordine	Dose di siero inoculata	Dose di vaccino inoculata	Infezione 2 - 5 - 04	Esito
1 Ratto	c. c. 2	c. c. 4	$\frac{1}{1000}$ di ansa	Muore 13 - 5 - 04
2 »	»	»	»	» 16 - 5 - 04
3 »	»	»	»	Vive
4 »	»	»	»	»
5 »	»	»	»	»
6 »			»	Muore 7 - 5 - 04
(Controllo)				
7 »			»	» »
8 »			»	» »

TABELLA N. 31.

Sierovaccinazione.

(Infezione 72 ore dopo la sierovaccinazione).

N. d'ordine	Dose di siero inoculata	Dose di vaccino inoculata	Infezione 3 - 5 - 04	Esito
1 Cavia	c. c. 2	c. c. 4	$\frac{1}{1000}$ di ansa	Muore 14 - 5 - 04
2 »	»	»	»	» »
3 »	»	»	»	» 15 - 5 - 04
4 »	»	»	»	» 16 - 5 - 04
5 »	»	»	»	Vive
6 »			»	Muore 8 - 5 - 04
(Controllo)				
7 »			»	» »
8 »			»	» »

TABELLA N. 32.

Sierovaccinazione.

(Infezione 72 ore dopo la sierovaccinazione).

N. d'ordine	Dose di siero inoculata	Dose di vaccino inoculata	Infezione 3 - 5 - 04	Esito
1 Ratto	c. c 2	c. c. 4	$\frac{1}{1000}$ di ansa	Muore 11 - 5 - 04
2 »	»	»	»	» 14 - 5 - 04
3 »	»	»	»	» »
4 »	»	»	»	» 16 - 5 - 04
5 »	»	»	»	Vive
6 »	»	»	»	»
7 »			»	Muore 7 - 5 - 04
(Controllo)				
8 »			»	» »
9 »			»	» »

TABELLA N 33.

Sierovaccinazione.

(Infezione 96 ore dopo la sierovaccinazione).

N. d'ordine	Dose di siero inoculata	Dose di vaccino inoculata	Infezione 4 - 5 - 04	Esito
1 Cavia	c. c. 2	c. c. 4	$\frac{1}{1000}$ di ansa	Muore 14 - 5 - 04
2 »	»	»	»	» »
3 »	»	»	»	» 15 - 5 - 04
4 »	»	»	»	» 16 - 5 - 04
5 »	»	»	»	Vive
6 »	»	»	»	Muore 9 - 5 - 04
(Controllo)				
7 »			»	» »
8 »			»	» »

TABELLA N. 34.

Sierovaccinazione.

(Infezione 96 ore dopo la sierovaccinazione).

N. d'ordine	Dose di siero inoculata	Dose di vaccino inoculata	Infezione 4 - 5 - 04	Esito
1 Ratto	c. c. 2	c. c. 4	$\frac{1}{1000}$ di ansa	Muore 14 - 5 - 04
2 »	»	»	»	» 16 - 5 - 04
3 »	»	»	»	» 17 - 5 - 04
4 »	»	»	»	Vive
5 »	»	»	»	»
6 »	»	»	»	»
7 »			»	Muore 9 - 5 - 04
(Controllo)			»	
8 »			»	» »
9 »				» »

TABELLA N. 35.

Sierovaccinazione.

(Infezione 120 ore dopo la sierovaccinazione).

N. d'ordine	Dose di siero inoculata	Dose di vaccino inoculata	Infezione 5 - 5 - 04	Esito
1 Cavia	c. c. 2	c. c. 4	$\frac{1}{1000}$ di ansa	Muore 13 - 5 - 04
2 »	»	»	»	» 15 - 5 - 04
3 »	»	»	»	» 16 - 5 - 04
4 »	»	»	»	» 17 - 5 - 04
5 »	»	»	»	Vive
6 »	»	»	»	Muore 10 - 5 - 04
(Controllo)				
7 »			»	» »
8 »			»	» »

TABELLA N. 36.

Sierovaccinazione.

(Infezione 120 ore dopo la sierovaccinazione).

N. d'ordine	Dose di siero inoculata	Dose di vaccino inoculata	Infezione 5 - 5 - 04	Esito
1 Ratto	c. c. 2	c. c. 4	$\frac{1}{1000}$ di ansa	Muore 14 - 5 - 04
2 »	»	»	»	» 15 - 5 - 04
3 »	»	»	»	» 16 - 5 - 04
4 »	»	»	»	Vive
5 »	»	»	»	»
6 »	»	»	»	»
7 »			»	Muore 9 - 5 - 04
(Controllo)				
8 »			»	» »
9 »			»	» »

1) *Infezione contemporanea alla siero-vaccinazione.*

a) *Cavie.* - A 5 cavie furono inoculati sotto cute, separatamente in due punti diversi del corpo, 2 cmc. di siero antipestoso e due dosi di vaccino della Commissione tedesca. Subito dopo queste 5 cavie e 3 di controllo furono infettate con $^1/_{1000}$ di ansa della nostra solita cultura di peste.

I controlli morirono di peste dopo 5 giorni: mentre che delle 5 cavie trattate colla siero-vaccinazione una sopravvisse e 4 morirono 3-4 giorni dopo i controlli.

b) *Ratti.* - Di 5 ratti sottoposti allo stesso trattamento col siero e col vaccino ed infettati contemporaneamente con $^1/_{1000}$ di ansa di cultura di peste, 3 sopravvissero e 2 morirono 6-9 giorni dopo i tre controlli.

2) *Infezione 24 ore dopo la siero-vaccinazione.*

a) *Cavie.* - A 5 cavie, trattate sempre nello stesso modo e colla stessa quantità di siero e vaccino antipestoso, s'inoculò sotto cute dopo 24 ore $^1/_{1000}$ di ansa di cultura di peste.

Una cavia sopravvisse: le altre morirono 4-7 giorni dopo le tre cavie di controllo, che morirono dopo 5 giorni per setticemia pestosa.

b) *Ratti.* — Di 6 ratti sottoposti alla siero-vaccinazione e infettati di peste 24 ore dopo, 3 sopravvissero e 3 morirono 2-4-12 giorni dopo i 3 controlli.

3) *Infezione 48 ore dopo la siero-vaccinazione.*

a) *Cavie.* - Di 5 cavie trattate sempre nello stesso modo col siero e col vaccino antipestoso e infettate sempre colla stessa quantità di peste 48 ore dopo, ne soppravvisse una: e le altre 4 morirono 4-5 giorni dopo le 3 cavie di controllo, che morirono costantemente dopo 5-6 giorni di setticemia pestosa.

b) *Ratti.* - Di 5 ratti sottoposti allo stesso trattamento ed infettati di peste 48 ore dopo, 3 sopravvissero e 2 morirono 6-9 giorni dopo i controlli.

4) *Infezione 72 ore dopo la siero-vaccinazione.*

a) *Cavie.* - 5 cavie furono infettate colla stessa quantità di cultura di peste 72 ore dopo aver subìta la siero-vaccinazione praticata sempre allo stesso modo. Contemporaneamente furono infettate 3 cavie per controllo.

Delle 5 cavie sottoposte alla siero-vaccinazione una ne sopravvisse e le altre 4 morirono 5-7 giorni dopo i controlli, che morirono di setticemia pestosa in 5ª-6ª giornata.

b) *Ratti.* - Allo stesso trattamento furono sottoposti 6 ratti ed infettati dopo 72 ore. Di questi 6 ratti, 5 sopravvissero e 4 morirono, 4-7-9 giorni dopo i 3 controlli.

5) *Infezione 96 ore dopo la siero-vaccinazione.*

a) *Cavie.* - Di cinque cavie, sottoposte alla siero-vaccinazione e infettate di peste dopo 96 ore, una sopravvisse e le altre quattro morirono 5-7 giorni dopo i controlli.

b) *Ratti* - Di sei ratti, sottomessi allo stesso trattamento e infettati di peste dopo 96 ore, tre sopravvissero e tre morirono 5-8 giorni dopo i tre controlli.

6) *Infezione 120 ore dopo la siero-vaccinazione.*

a) *Cavie.* - Di cinque cavie infettate 120 ore dopo aver subita la siero-vaccinazione, una sopravvisse e le altre quattro morirono 3-7 giorni dopo i controlli.

b) *Ratti.* - Di sei ratti invece infettati 120 ore dopo la siero-vaccinazione, tre si salvarono e tre morirono 5-7 giorni dopo i controlli.

Osservazioni.

Da queste nostre esperienze risulta, che di 30 cavie, inoculate contemporaneamente con siero e vaccino antipestoso ed infettate appena dopo o nei primi cinque giorni, se ne salvarono sei (circa il 20 %) e le altre mostrarono sempre un ritardo nella morte rispetto ai controlli. Di 34 ratti invece sottoposti alla sie-

ro-vaccinazione e infettati di peste o contemporaneamente o nei primi cinque giorni, se ne salvarono 16 (quasi il 50 %) e gli altri morirono sempre parecchi giorni dopo i controlli.

Sarebbe stato nostro desiderio di continuare queste esperienze per stabilire dei termini di paragone tra l' immunità conferita dalle siero-vaccinazioni e quella conferita dalle sole vaccinazioni e dal solo siero antipestoso. Ma per mancanza di tempo utile abbiamo dovuto rinunziare a una serie di esperimenti, per cui sarebbero stati necessari parecchi altri mesi di osservazione.

I risultati del resto ottenuti da noi colle siero-vaccinazioni non mancano di una certa importanza. Essi ci dimostrano nel modo migliore, che inoculando contemporaneamente, in due punti diversi del corpo dell'animale, il siero e il vaccino antipestoso, si vengono ad evitare gl' inconvenienti delle vaccinazioni, quando sono praticate o durante il periodo d' incubazione della malattia o pochi giorni prima che avvenga l' infezione.

Ma prima di proclamare l'efficacia delle siero-vaccinazioni e la possibilità di sostituirle nella pratica all' uso delle sole vaccinazioni o del solo siero antipestoso, è necessario di stabilire con ogni approssimazione la durata della immunità conferita con esse.

E nello stesso tempo nuove ricerche sono necessarie per stabilire su dato di fatto quale sia il metodo da preferirsi nella pratica delle siero-vaccinazioni :

1) inoculazione del siero e vaccino dopo averli mescolati insieme ;

2) inoculazione contemporanea del siero e vaccino, ma effettuata separatamente in diversi punti del corpo dell'animale ;

3) inoculazione in primo tempo del siero, e dopo tre, quattro o cinque giorni del vaccino.

A proposito delle siero-vaccinazioni va studiata e risoluta la seguente questione : il vaccino e il siero antipestoso inoculati contemporaneamente in un animale esplicano la loro azione indipendentemente l'uno dall'altro : oppure l'azione dell' uno ostacola e neutralizza l'azione dell' altro ?

E qui è bene notare come in diverse infezioni furono adoperate

le siero-vaccinazioni a scopo profilattico; ma invece delle culture uccise al calore furono sempre e in tutti i casi adoperate culture vive e virulente. Così si usò la siero-vaccinazione nel mal rosso dei suini, in cui dal *Leclainche* (1) furono usati il siero e la cultura di bacillo del mal rosso vivente mescolati insieme e dal *Lorenz* (2) inoculati separatamente: nella pneumonite contagiosa dei suini (*Schweineseuche dei Tedeschi*) dallo *Schreiber* (3), *Wassermann* ed *Ostertag* (4); nella peste bovina dal *Kolle* (5) mediante l'inoculazione di siero di animali guariti e di sangue virulento di animali infetti; nel carbonchio ematico *Sobernheim* (6), che inoculò in primo tempo il siero e dopo culture vive di carbonchio.

Che in questi casi in cui si usano culture viventi e virulente il siero specifico eserciti un'azione nociva su quella immunizzante dei batteri, è stato dimostrato da diversi autori. Il *Beinarowitsch* (7) sperimentando coi bacilli viventi della peste e col siero antipestoso arrivò alla seguente conclusione: l'attitudine dei bacilli pestosi nell'elaborare l'immunità attiva e la durata di questa, sono in ragione inversa della quantità di siero antipestoso inoculato.

Allo stesso risultato arrivarono *M. R. Pfeiffer e Friedberger* (8) lavorando sul vibrione del colera.

Essi inocularono a una serie di animali una dose di vibrioni colerici capace di produrre nel sangue di questi animali degli anticorpi. Ad un'altra serie di animali inocularono la stessa dose di vibrioni più quantità crescenti di siero anticolerico. Essi po-

(1) *Leclainche.* - Compt. rend, Soc. de Biologie 1897 e 1899 - La sérothérapie du rouget des porcs - Toulouse 1900.

(2) *Lorenz.* - Centr. f. Bakt. Bd. 13 1893, Bd. 15 1894 e D. Tierärztlich. Woch 1896.

(3) *Schreiber.* - Berlin. thierärztliche Woch. 1899, 1902.

(4) *Wassermann und Ostertag.* - Monatshefte f. prakt. Tierheilkunde Bd. 13 - Berl. tierarzt. Woch. 1902.

(5) *Kolle u. Turner.* - Zeitschr. f. Hyg. Bd. 29.

(6) *Sobernheim.* - Berl. Klin. Woch. 1902.

(7) *Beinarowitsch.* - l. c.

(8) *Pfeiffer u. Friedberger* - Ueber Antikörper gegen die bakteriolytischen Immunkörper der Cholera - Berl. Klin. Woch. 1902.

terono constatare che più siero specifico si aggiungeva insieme alla dose di vibrioni colerici e meno questi animali elaboravano degli anticorpi: fino ad arrivare ad un punto in cui tale elaborazione era nulla.

Va da sè, che i risultati di questi esperimenti non possono essere applicati senz'altro alle siero-vaccinazioni nella peste, ove invece di bacilli vivi e virulenti sono inoculati bacilli uccisi al calore.

In questo senso invece grande importanza potrebbe avere il fatto stabilito dal *Pfeiffer* (1) per il colera e dal *Kolle* (2) per la peste, che i sieri specifici battericidi, anche fortemente attivi, non hanno nessuna azione sui veleni contenuti nel corpo batterico.

Il *Kolle* infatti emulsionò in brodo sterile delle culture di peste su agar, le riscaldò per un'ora a 60° uccidendo i bacilli e stabilì la dose mortale di questa emulsione per i ratti in seguito ad inoculazione intraperitoneale. Sia mescolando il siero antipestoso col doppio di tale dose mortale di culture morte di peste, sia inoculando separatamente il veleno e il siero nel peritoneo dei ratti, il *Kolle* potè constatare che il siero non esercitava nessuna azione sul veleno batterico: i ratti così trattati morirono come quelli inoculati colle sole culture morte.

Se teniamo conto dei risultati da noi ottenuti colle nostre ricerche sulle siero-vaccinazioni nell' infezione pestosa, dobbiamo ritenere, che negli animali trattati contemporaneamente col siero e col vaccino antipestoso si manifesta un' immunità pronta, sicura, completa, come in quelli trattati solo col siero antipestoso.

L' inoculazione del vaccino quindi non ostacola, nè neutralizza l' azione protettiva del siero.

Da ciò per analogia si potrebbe anche dedurre, che nemmeno il siero abbia influenza alcuna sul vaccino, ostacolando o neutralizzando la sua capacità nel produrre l' immunità attiva.

Ma non avendo nessun esperimento sulla durata dell' immunità

(1) *Pfeiffer*. - l. c.
(2) *Kolle*. - l. c.

conferita dalle siero-vaccinazioni, noi ci asteniamo quì dal manifestare qualunque giudizio sul riguardo.

Noi ci auguriamo di poter stabilire delle ricerche comparative per ciò che riguarda la durata e l' intensità dell' immunità conferita dalle soli vaccinazioni, dal solo siero, e dalle siero-vaccinazioni. E solo allora potremo dare un giudizio sulla possibilità di adoperare nella profilassi dell' infezione pestosa le siero-vaccinazioni allo scopo di poter ottenere la rapida immunità conferita dal siero e l'immunità duratura conferita dai vaccini antipestosi.

E la possibilità di adoperare nell'uomo le siero-vaccinazioni antipestose dimostra ancora una volta l'esatezza di quanto noi abbiamo detto, che le vaccinazioni e l'uso del siero antipestoso non si escludono nella profilassi medica della peste, come vogliono alcuni autori; ma si completano a vicenda e rappresentano entrambi, usati con discernimento, un mezzo potente di lotta e un coefficiente prezioso di vittoria nell'arrestare la diffusione di un'epidemia pestosa.

Da ciò risulta anche la necessità di avere, a propria disposizione una forte quantità di siero antipestoso molto attivo per una profilassi completa e razionale. E questa necessità fu sentita da diversi autori e in tempi diversi.

Nella Conferenza scientifica sulla peste tenuta a Berlino nel 1899 per iniziativa dell'ufficio imperiale di Sanità pubblica, dai numerosi convenuti fu votato all'unanimità un ordine del giorno per la fondazione in Germania di un Istituto per la produzione del siero antipestoso.

Il *Koch* (1) nel 1901 scriveva:

« Per i risultati ottenuti in questo Istituto (Istituto delle ma-
« lattie infettive di Berlino) dagli studi sulla peste e per ana-
« logia colle esperienze istituite sull' immunizzazione nel colera
« e nel tifo, le quali secondo l' opinione comune valgono anche
« per il siero antipestoso, io ritengo non sia esclusa la possibi-
« lità, che seguendo un'altra via e altri metodi di quelli seguiti

(1) Berichte über die Wertbestimmung des Pariser Pestserums erstattet von Prof. R. Koch, v. Behring, ec. già citato.

« dal dott. *Lustig* e dal dott. *Roux* si possa ottenere un siero
« più attivo. A questo scopo è necessario di stabilire delle ri-
« cerche sui grossi animali, come i cavalli.

E quindi il *Kock* presentava un progetto di una scuderia da annettersi all' Istituto delle malattie infettive di Berlino.

Tanto più opportuno a noi sembra l' istituire delle ricerche su questo argomento, in quanto oggi a sei anni di distanza noi potremmo ripetere le parole scritte dal *Metchnikoff* fino dal 1898:

In teoria la sieroterapia antipestosa deve essere considerata come risoluta; ma nella pratica bisogna sforzarsi di avere dei sieri molto più attivi di quelli ottenuti finora.

Nel mettere fine all' esposizione delle nostre ricerche, ci auguriamo di poter aver anche noi l'opportunità di risolvere le numerose questioni d' interesse teorico e pratico sul siero antipestoso.